

**“Vacuolas asociadas a la senescencia”:
participación en la degradación de proteínas
fotosintéticas e interacción con la vía
autofágica.**

TESIS DOCTORAL

Lic. Cristian Antonio Carrión

Director: Dr. Juan José Guiamét

-2012-



Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Universidad Nacional de La Plata

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales, fue realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal de La Plata (INFIVE) CONICET- UNLP, bajo la dirección del Dr. Juan José Guiamét.

Foto de tapa: Microfotografía confocal pseudo-coloreada del mesófilo de *Arabidopsis thaliana* senescente. Las “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” (de color rojo) rodean a los cloroplastos (de color azul).

Dedicado a:

Luis A. Carrión, mi papá de la Vida.

Humberto A. Lagiglia, mi padre en la Ciencia.

Mi familia.

Mi agradecimiento:

A Paulina, que con paciencia y ternura me acompaña desde hace 5 años.

A mi madre, que siempre me apoyó en todos los proyectos.

A Lorenza, por ser una excelente codirectora, aunque sin ese título.

A Juan José, por su valiosa guía y paciencia.

A Nora y Cacho, quienes me adoptaron en su hogar.

A Diego y Eduardo por las charlas divertidas y sugerencias inteligentes.

A mis compañeros de la Cátedra de Química Biológica, en especial a Aldana.

A Alicia, quien me transmitió la pasión por las plantas desde mis 10 años.

A Diana, quien me ayudó a obtener las mejores fotos confocales.

A Christina, Julien y Klaus, quienes me recibieron con afecto en Alemania.

Al INFIVE y su gente, mi segundo hogar desde hace 6 años.

Trabajos científicos en elaboración o publicados, en relación a esta Tesis Doctoral.

- In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of “Senescence Associated Vacuoles” in chloroplast protein degradation in tobacco leaves. **Cristian A. Carrión**, María Lorenza Costa, Dana E. Martínez, Christina Mohr, Klaus Humbeck, Juan J. Guamét. (2012). En preparación.
- “Chloroplast Protein Degradation: Involvement of Senescence-Associated Vacuoles” Costa, M.L., Martínez, D.E., Gomez, F.M., **Carrión, C.A.**, and Guamét, J.J. (2012). En prensa como capítulo del libro “Advances in Photosynthesis and Respiration” Chloroplast development during leaf growth and senescence. (Series Editors: Govindjee and Thomas D. Sharkey).
- Chlorophyll and PSI in “senescence-associated vacuoles”. Facundo M. Gomez, María Lorenza Costa, **Cristian A. Carrión**, Christine Desel, Thomas Kieselbach, Christiane Funk, Karin Krupinska, Juan J. Guamét. En preparación.

Resúmenes presentados en congresos científicos, en relación a esta Tesis Doctoral.

- **Cristian Carrión**, M. Lorenza Costa, Dana E. Martínez, Juan J. Guamét. 2008. Proteasas cisteínicas en las “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” de hojas de tabaco. XIII Reunión Latinoamericana, XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Actas. Ciudad de Rosario, Santa Fé. Con referato. Pág. 231.
- **Carrión CA**; Martínez DE; Costa ML; Guamét JJ. 2009. “Chloroplast proteins are degraded by cysteine-proteases in senescence-associated vacuoles”. Biocell 33 (suppl.) Pág. 138.
- **Cristian Carrión**, M. Lorenza Costa, Juan José Guamét. 2010. La pérdida de actividad autofágica altera la retranslocación de aminoácidos durante la senescencia en hojas de Arabidopsis t. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. La Plata, Argentina. Con referato. Pág. 165.
- Rolny NS, Costa ML, **Carrión CA**, Guamét JJ. 2010. Relación entre pérdida de electrolitos, integridad de membranas y acumulación de amonio durante la senescencia de hojas. X Congreso Latinoamericano de Botánica. La Serena, Chile. Pág. 89.
- Julien Hollmann, **Cristian Carrión**, Andrea Matros, Per L. Gregersen, Hans-Peter Mock, Juan J. Guamét, Karin Krupinska. (2011) “Identification of a cysteine protease in senescent barley leaves”. The 1st International conference on PLANT PROTEASES 2011. “From biology to biotechnology”. Hemavan, Sweden.

INDICE

	Pag.
Resumen	1
Abstract	5
Abreviaturas	9
Capítulo I - Introducción General	12
- El concepto de senescencia	13
- Procesos principales que participan en la senescencia	18
- Procesos oxidativos	19
- Flujo metabólico	20
- Regulación hormonal	22
- Autofagia	27
- Degradación de componentes fotosintéticos	29
- Degradación extraplastidial de componentes fotosintéticos	31
- Vacuolas Asociadas a la Senescencia (VAS)	34
- Delimitación del objeto de estudio	38
- Objetivos e hipótesis	40
Capítulo II - Materiales y Métodos	41
- Material biológico y obtención de muestras	42
- Material Vegetal y condiciones de cultivo	42
- Inducción de la senescencia	43
- Homogenatos de hojas	44
- Aislamientos de VAS	45
- Tratamiento con termolisina	46
- Concentración de la F3	46
- Aislamiento de cloroplastos	47
- Aislamiento de células	47
- Obtención del exudado floemático	48
- Análisis de proteínas	48
- Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	48
- Tinción de proteínas en gel	49
- Western-blot	49
- Cuantificación de proteínas	50
- Cuantificación de aminoácidos	51
- Detección y purificación de proteasas	52
- Detección de proteasas cisteínicas	52
- Purificación de proteasas cisteínicas	53
- Medición del contenido de clorofila mediante SPAD y Espectrofotometría	54
- Medición del rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II	54
- Microscopía	54
- Microscopía de fluorescencia y confocal	54
- Detección de VAS por su acidez	55

- Detección de la actividad de proteasas cisteínicas en las VAS	56
- Inmunofluorescencia	56
- Corrección y análisis de imágenes	57
- Actividad de proteasas	57
- Autodigestión de VAS	57
- Inhibición <i>in vivo</i> de proteasas cisteínicas	58
- PCR en tiempo real	58
- Elección de los genes	59
- Diseño de cebadores	59
- Extracción de RNA total	60
- Análisis de RNA total	61
- Transcripción reversa	61
- PCR en tiempo real	61
Capítulo III - Desarrollo de las Vacuolas Asociadas a la Senescencia	64
- Introducción	65
- Resultados	68
- Descripción del modelo de estudio: senescencia inducida por corte y oscuridad.	68
- Cambios en la abundancia de las VAS en el curso de la senescencia inducida.	69
- Presencia de SAG12:GFP durante el desarrollo de las VAS	72
- La aparición de las VAS se corresponde con el período de mayor degradación de los componentes cloroplásticos.	73
- Correlación entre la expresión de genes asociados a la senescencia y el desarrollo de las VAS.	76
- Acidificación de la fracción enriquecida en VAS durante la senescencia	78
- Efecto del etileno y las citocininas sobre el desarrollo de las VAS	79
- La adición exógena de Glutamina inhibe la aparición de VAS	82
- Una fusión del dominio trans-membrana de la Manosidasa I fusionado a YFP se localiza en las VAS	86
- Discusión	90
- Un pulso de VAS en el periodo de mayor actividad lítica	90
- La acidificación de las VAS	92
- La aparición de las VAS está modulada hormonalmente	93
- El efecto inhibitorio de la Glutamina en la aparición de las VAS	94
- Un marcador del Aparato de Golgi en las VAS	95
Capítulo IV - Actividad proteolítica de las Vacuolas Asociadas a la Senescencia	97
- Introducción	98
- Resultados	100
- Las proteasas cisteínicas son las principales proteasas en las VAS	100
- Detección y purificación de proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia en las VAS	101
- La inhibición <i>in vivo</i> de proteasas cisteínicas reduce la degradación de	104

proteínas cloroplásticas	
- La inhibición de H ⁺ -ATPasa inhibe la acidificación y la actividad proteolítica en las VAS	109
- La proteasa cisteínica SAG12 esta presente en las VAS de tabaco	111
- Presencia de PsaA en las VAS	113
- Discusión	114
- Degradación de Rubisco por proteasas cisteínicas en las VAS	114
- Proteasas cisteínicas en las VAS	115
- Proteólisis extra-plastidial	117
Capítulo V - Autofagia y Vacuolas Asociadas a la Senescencia	118
- Introducción	119
- El mecanismo de la Autofagia	119
- Funciones de la Autofagia	120
- Autofagia y la degradación de cloroplastos	123
- Resultados	125
- Un mutante de la vía autofágica y el síndrome de la senescencia	125
- Alteración en la translocación de aminoácidos en atg5-1	127
- La inactivación de la autofagia produce un cambio en el patrón de marca de <i>Lysotracker Red</i> en células senescentes	128
- Detección de ATG8 en las VAS	131
- Discusión	137
- ¿La disrupción de la autofagia acelera la senescencia?	137
- Comparación de las VAS con estructuras autofágicas	141
- Sobre el efecto de ATG5-1 en las VAS	143
- Las VAS poseen ATG8	145
- El mecanismo de autofagia está involucrado en las VAS	146
Capítulo VI - Conclusiones y Perspectivas	148
- Sobre el Desarrollo de las VAS	149
- Sobre la actividad biológica de las VAS	151
- Sobre la relación entre la Autofagia y las VAS	153
Bibliografía	157

Resumen

La senescencia es la última etapa del desarrollo de los organismos. Este proceso ha sido estudiado ampliamente en la plantas y se caracteriza por la caída de la actividad fotosintética, desintegración de la estructura de las organelas, incremento de la actividad proteolítica, pérdida de clorofila y proteínas, daño oxidativo acumulativo y aparición de estructuras de autofagia. Los cambios enumerados son sólo algunos de los más evidentes síntomas de la senescencia foliar y la manifestación de estos cambios depende del estímulo que prevalece y del estado fisiológico de la célula/planta. Los factores que pueden desencadenar la senescencia foliar son diversos. Sólo como ejemplos se pueden nombrar los hormonales, el estrés biótico y abiótico, e inducidos por oscuridad, por corte o hambreado.

La mayoría de los cambios iniciales que definen a la senescencia foliar ocurren en los cloroplastos. El estudio de la degradación de los cloroplastos es clave para entender la senescencia en plantas. Alcanzar una comprensión del mecanismo y regulación de la degradación de los cloroplastos durante la senescencia es crucialmente importante en cualquier intento de prolongar la etapa fotosintéticamente activa de los cultivos y/o mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno. En los últimos años, las investigaciones en el tema apuntan a mecanismos de degradación extraplastidial de los componentes de los cloroplastos. Las Vacuolas Asociadas a la Senescencia (VAS) constituyen el modelo más desarrollado sobre el desmantelamiento del aparato fotosintético en la senescencia foliar. El término VAS hace referencia a pequeñas vacuolas, claramente diferenciadas de la vacuola central, abundantes en células senescentes pero ausentes en hojas maduras. Han sido caracterizadas como compartimientos ácidos y con la capacidad de degradar clorofilas y proteínas del estroma del cloroplasto.

Este trabajo de tesis pretende profundizar el conocimiento de las VAS a través de tres temáticas: - el desarrollo, entendido como la variación temporal de las VAS, su biogénesis y el efecto de moduladores de la senescencia; - la caracterización de la actividad biológica de las VAS participando en el desmantelamiento del aparato fotosintético; - y la relación entre el mecanismo de autofagia y el desarrollo de las VAS. En general, para abordar estos objetos de estudios se empleó un sistema sencillo y frecuentemente empleado en trabajos sobre senescencia foliar. El modelo de senescencia inducida permite trabajar en un sistema relativamente homogéneo y reproducible. Consiste en separar las hojas de la planta, tratarlas con un precursor de la hormona

etileno, denominado etefón, y almacenarlas en oscuridad. De esta manera, la senescencia es inducida por el corte y la oscuridad, y sincronizada a nivel tisular por el tratamiento hormonal.

Se estudió la dinámica de las VAS durante la senescencia inducida en oscuridad en hojas de *Nicotiana tabacum*. Para esto se tomaron parámetros de senescencia, se cuantificó la expresión de genes asociados a la senescencia y se realizó un seguimiento, mediante microscopía confocal, de la aparición de las VAS a lo largo de 6 días en oscuridad de hojas cortadas de la planta. A partir de tejidos y de células aisladas de hojas de tabaco en distintos estados de senescencia y tratadas con *Lysotracker Red* (un marcador de compartimientos ácidos) se observó un patrón de aparición reproducible de las VAS. En la mayoría de las hojas evaluadas se detectó un pulso de VAS entre los días 2 y 4 desde la inducción de la senescencia. El pulso de VAS está perfectamente sincronizado con el periodo de mayor actividad lítica de las hojas (degradación de proteínas y clorofila) y la caída del rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II. La expresión del gen SAG12 (marcador molecular de la senescencia en plantas) aumenta hasta 7 veces durante la ventana de aparición de las VAS. Estos resultados sugieren que las VAS poseen un papel central en el proceso de senescencia foliar.

La senescencia es un proceso que está fuertemente modulado por el etileno y las citocininas. El efecto de estas fitohormonas sobre la aparición de las VAS fue evaluado en hojas de tabaco. Coincidentemente con reportes anteriores, la aplicación de etefón en hojas produce la aceleración de la clorosis y degradación de proteínas a las 48 h en oscuridad. En las hojas tratadas con etefón, el número de VAS duplicó a las detectadas en el control. En contraste, la aplicación de Bencil-amino-purina (BAP), una citocinina sintética, redujo fuertemente la clorosis y la degradación de proteínas en las hojas. En el tratamiento con BAP no se detectaron VAS a las 48 h post-inducción a pesar de que el pulso de VAS ya es evidente en el control. Entonces, las citocininas inhiben o al menos retrasan la aparición de las VAS durante la senescencia inducida por oscuridad.

El estado nutricional de la planta, y más aún, el balance Nitrógeno/Carbono entre los órganos que son Fuente y Destino de nutrientes, es clave en la regulación de la senescencia foliar. En especies monocárpicas (la mayoría de las especies de interés agronómico) el desarrollo de las estructuras reproductivas demandan la redistribución de una porción significativa de las biomoléculas foliares. En tabaco, la glutamina (Gln) es la forma más importante de exportación de aminoácidos durante la senescencia foliar. La incubación de discos de tabaco con Gln en oscuridad

retrasó los síntomas de la senescencia respecto a un control sin Gln. La aplicación de Gln bloqueó la aparición de las VAS mientras que en el control el pulso de VAS fue normal. Resulta evidente que las VAS participan de un mecanismo regulado por el estado nutricional de la célula/planta y que está modulado por las fitohormonas.

Previamente se ha reportado que las VAS poseen componentes de los cloroplastos. Sin embargo la intensa actividad lítica y la acidez de las VAS, sugiere la participación de otro(s) elemento(s) celular(es) en su biogénesis. Se encontró que las VAS poseen α -manosidasa I (ManI), una proteína marcadora del Aparato de Golgi. En plantas senescentes de *Arabidopsis* que expresan el dominio trans-membrana de ManI fusionada a YFP, se observó que parte de la señal de YFP se localiza en las VAS. La colocalización de clorofila, *Lysotracker Red* y ManI:YFP en vesículas de aproximadamente 1 μ m, sugiere que el Aparato de Golgi podría estar involucrado en la biogénesis de las VAS.

En este trabajo, se empleó un sistema de detección de proteasas cisteínicas basado en la actividad para estudiar proteasas asociadas a la senescencia, tanto en extractos crudos de hoja como en la fracción enriquecida en VAS. Las proteasas cisteínicas más abundantes del extracto crudo (proteasas de 40 y 33 kDa) también aparecen en las VAS sugiriendo que estas últimas tienen una participación importante en la actividad proteolítica de la célula durante la senescencia. La degradación de la subunidad grande y pequeña de Rubisco de tabaco es inhibida por el tratamiento con E-64 (inhibidor de proteasas cisteínicas) tanto en un sistema *in vitro* como *in vivo*. La función de las VAS como compartimiento lítico asociado a la degradación de los cloroplastos fue demostrada con el empleo de la sonda fluorescente R6502 y experimentos *in vivo* de inhibición farmacológica de la acidificación de las VAS y de sus proteasas cisteínicas. Las evidencias mostradas en este trabajo ponen en manifiesto la importancia relativa de la participación de las VAS en la degradación de Rubisco durante la senescencia foliar.

Se han reportado estructuras autofágicas conteniendo proteínas estromáticas en el citoplasma y vacuola central de células senescentes en varias especies, lo cual permitiría relacionar la autofagia con la degradación de cloroplastos. Sin embargo la disrupción del mecanismo de autofagia por *knock outs* en sus genes esenciales, en lugar de retrasar o bloquear la senescencia produce la aceleración de la degradación de proteínas y clorofilas. Esta aparente contradicción podría encontrar una posible explicación sobre la base de los resultados que se obtuvieron con el mutante *atg5-1*. La inducción de la senescencia por oscuridad en el mutante *atg5-1* produce una

clorosis acelerada en relación al genotipo salvaje (*wt*). Sin embargo, a pesar de registrarse una degradación acelerada de Rubisco y de otras proteínas de alto peso molecular, en el perfil de proteínas se evidenció que esta degradación es parcial. Es decir, en el mutante de autofagia ocurre la acumulación de fragmentos de proteínas y péptidos pequeños durante la senescencia. Complementariamente, mientras que en el *wt* se cuantificó un incremento de los aminoácidos exportados desde las hojas senescentes, en *atg5-1* no se registró variación. Estos resultados sugieren que la anulación de la autofagia impide la degradación completa de proteínas hasta obtener aminoácidos, los cuales deberían ser el producto de la senescencia foliar.

Finalmente se evaluó la relación entre el mecanismo de autofagia y las VAS. Se comparó el patrón de vesículas marcadas con *Lysotracker Red* en hojas senescentes de *atg5-1* y *wt*. En el *wt* se detectaron dos poblaciones de vesículas diferenciadas por sus diámetros que en promedio tenían 970 y 590 nm, pero en las células de *atg5-1* las vesículas de 970 nm eran escasas o ausentes. La marca de *Lysotracker Red* en *atg5-1* fue menos discreta que en *wt*, donde se podían distinguir las vesículas fácilmente. Estas observaciones sugieren, al menos, que el bloqueo de la autofagia modifica el patrón de localización del *Lysotracker Red*, empleado para la detección de las VAS.

La proteína de membrana ATG8 fusionada a GFP es empleada como marcador de estructuras autofágicas en levaduras, plantas y animales. La observación *in vivo* de células senescentes de *Arabidopsis* que expresa ATG8:GFP permitió localizar ATG8 en la mayoría de las VAS. Además, el anticuerpo contra ATG8 detectó bandas específicas sólo en la fracción enriquecida en VAS, en comparación con el extracto crudo de la misma hoja. La detección de ATG8 en las VAS y no en el extracto crudo evidencia que las VAS están enriquecidas en este marcador de autofagia. Estos resultados indican que la autofagia está implicada en algún punto del desarrollo de las VAS.

Como conclusiones generales de esta tesis se pueden realizar las siguientes afirmaciones:

- 1- Las VAS son vesículas derivadas de la fracción estromática del cloroplasto y del Aparato de Golgi.
- 2- El periodo de mayor actividad lítica de la hoja se corresponde a un pulso de VAS que está regulado por Etileno, Citocininas y responde directamente al estado nutricional de la célula/planta.
- 3- Proteasas cisteínicas dependientes de la acidez degradan Rubisco en las VAS.
- 4- El mecanismo de autofagia participa en el desarrollo de las VAS.

Abstract

Senescence is the last developmental phase in the life of individuals, organs, tissues or cells. In leaves, senescence is characterized by photosynthesis decline, desintegration of organelles, increased proteolytic activity, loss of chlorophyll and proteins, oxidative damage, and the occurrence of autophagic structures. These are the most conspicuous changes during leaf senescence, but their manifestation depends on the senescence-inducing stimulus and the physiological status of the cell or individual. Various factors can trigger leaf senescence, including hormonal changes, biotic and abiotic stress, starvation, leaf excision and darkness.

Most of the early deteriorative changes during senescence affect the chloroplasts. An understanding of the mechanism and regulation of chloroplast breakdown is key in any effort to delay senescence to prolong photosynthetic activity, or accelerate senescence to increase N use efficiency. In recent years, extra-plastidial degradation of chloroplast components has received increasing attention. Senescence Associated Vacuoles (SAVs) are small vacuoles, clearly different from the much larger central vacuole, which are abundant in senescing cells but completely absent from mature, non-senescing leaves. SAVs are lytic compartments which could degrade chlorophyll and stromal proteins of the chloroplast.

This work aimed at extending our understanding of SAVs in three different areas: - 1 the changes in SAVs abundance, their biogenesis and the effects of senescence-modulating treatments, -2 the characterization of their biological activity, and, -3 the relationship between the autophagic pathway and SAVs. In general, senescence was induced by leaf detachment, treatment with ethephon (an ethylene precursor) and incubation in continuous darkness, which represents a simple and reproducible system that yields a relatively uniform pattern of senescence progression in different samples, and in different areas of each leaf.

The changes in SAVs abundance were studied in detached leaves of *Nicotiana tabacum* induced to senesce in darkness. The largest declines in chlorophyll and leaf

protein occurred between 2 and 4 days after senescence induction. Confocal microscopy of leaf pieces and isolated cells showed that the largest numbers of SAVs (stained with LysoTracker red, a marker for acidic compartments) were also seen between days 2 and 4. This pulse of SAVs coincided with the period of fastest degradation of chlorophyll and leaf protein. Likewise, the expression of SAG12 (a cysteine protease which is widely used as a marker of senescence, and a constituent of SAVs) increased 7-fold during the period of SAVs occurrence.

Senescence is strongly modulated by senescence-accelerating (e.g., ethylene) and senescence-retarding (e.g., cytokinins) hormones. Treatment with ethephon (an ethylene-releasing compound) accelerated chlorophyll and protein degradation, and caused a roughly 2-fold increase in the number of SAVs per cell. Benzil-amino-purine (BAP, a synthetic cytokinin) reduced chlorosis and protein degradation. After 2 days of incubation in darkness, SAVs were undetectable in BAP-treated cells. Thus, cytokinins might inhibit or delay the appearance of SAVs during dark-induced senescence.

The nutritional status of the plant, and the C/N balance between source and sink organs may modulate senescence. In monocarpic plants (most crops) growing reproductive structures (e.g., immature grains) cause nutrient remobilization from leaves by positively regulating leaf senescence. In tobacco, N is exported from senescing leaves in the form of glutamine (Gln). Incubation of leaf discs with Gln in darkness delayed senescence symptoms and reduced the number of SAVs per cell, compared to untreated controls. These results suggest that SAVs have a key role in degradation of chloroplast components during leaf senescence, and that their development is regulated by hormones and the nutritional status of cells.

Previous reports showed that SAVs contain chloroplast components. However, the intense proteolytic activity and acidity of SAVs suggests the involvement of other organelles in their biogenesis. SAVs were found to contain α -mannosidase I (ManI), a marker protein for the Golgi apparatus. In senescing leaves of an *Arabidopsis* line expressing the transmembrane domain of soybean ManI fused to YFP, the YFP signal

localized to SAVs. Colocalization of chlorophyll, *Lysotracker red* and ManI:YFP in structures approximately 1 μm in diameter suggests that the Golgi apparatus is involved in the biogenesis of SAVs.

An activity-based tagging approach was used to detect cysteine proteases in SAVs from senescing tobacco leaves. The cysteine proteases most abundant in a crude extract from senescing leaves (bands at 40 and 33 kDa) were also present in SAVs, indicating that SAVs concentrate a large part of the proteolytic activity of the senescing cell. E-64, a diagnostic inhibitor of cysteine proteases inhibited degradation of the small and large subunits of Rubisco, both *in vitro* and *in vivo*. These results were reinforced by confocal microscopy observations showing that most of the cysteine protease activity (detected with R6502, a fluorescent protease probe) resides in SAVs.

There are reports of autophagic structures containing stromal proteins of the chloroplast in the cytosol and central vacuole of senescing cells, which might implicate autophagy in chloroplast breakdown. However, disruption of autophagy in *knockout* lines for autophagy genes accelerates, rather than delay, protein and chlorophyll degradation. Senescence induction in darkness accelerated chloroplast breakdown of the Arabidopsis *atg5-1 knockout* mutant, compared to the wild type (wt). Although degradation of Rubisco and other proteins was accelerated in *atg5-1*, these leaves accumulated what appeared to be protein fragments of lower molecular mass, i.e., protein degradation did not seem to go to completion. While there was an increase in amino acid export from senescing leaves of wt, there was not change in amino acid export during senescence of *atg5-1*. Incomplete (i.e., not yielding amino acids) protein degradation might explain the decrease in amino acid export in autophagy mutants compared to wt.

In wt leaves, SAVs labeled with *Lysotracker red* could be assigned to two apparently different populations based on size, as determined by confocal microscopy, i.e., SAVs of 970 and 590 nm average diameter. In *atg5-1* cells there were few vesicles of 970 nm. These observations suggest that blockage of autophagy changes the pattern of *Lysotracker red* staining of SAVs.

The ATG8 protein, fused to GFP is routinely employed as a marker for autophagic structures in yeast, animals and plants. *In vivo* observations through confocal microscopy of senescing leaf cells of Arabidopsis expressing ATG8:GFP localized ATG8 to many SAVs . Likewise, an anti-ATG8 antibody detected ATG8 in isolated SAVs. Detection of ATG8 in isolated SAVs, but not in the crude leaf extract indicates that SAVs are enriched in ATG8. These results imply autophagy in some step of SAVs development.

The main conclusions of this thesis are that: -1 SAVs are made up of components derived from the chloroplast stroma and the Golgi apparatus, -2 the period of most intense lytic activity in senescing leaves coincides with a peak in the number of SAVs per cell, probably modulated by ethylene, cytokinins and the nutritional status of the cell, -3 cysteine proteases probably degrade Rubisco in SAVs, and, -4 autophagy may be involved in the development of SAVs.

- **Abreviaturas y Siglas:**

AEBSF: 4-(2-Aminoetil) benzenosulfonil-fluoride-hidroclorido, inhibidor de proteasas serínicas.

atg: Gen involucrado en la autofagia (del ingles: autophagy).

ATG: Proteína involucrada en la autofagia (del ingles: Autophagy).

ATPasa: Adenosín-trifosfatasa.

BAP: Bencil-amino-purina, una citocinina sintética.

C: Carbono.

Cvt: Vía de transporte del Citoplasma a la Vacuola (del ingles: *Cytoplasm to Vacuole Transport*).

DCG-04: Derivado biotinilado del E-64.

DECP: Dicarbonato de dietilo, empleado para la inactivación de RNAasas.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

E-64: Trans-epoxisuccinil-L-leucilamida(4-guanidino)butano, inhibidor de proteasas cisteínicas.

EC: Extracto crudo de hoja.

eco: Ecotipo.

EDTA: Ácido Etilen-diamino-tetracético.

EGTA: Ácido Etilen-glicol-tetracético.

et al: “y otros” (del latín: *et alli*)

F3: Fracción 3, corresponde a la fracción subcelular enriquecida en VAS.

Fig: Figura.

GFP: Proteína Verde Fluorescente (del ingles: *Green Fluorescent Protein*).

Gln: L-Glutamina.

GS: Glutamina Sintetasa.

KO: mutante por inserción de T-DNA (del ingles: *Knock out*)

LSU: Subunidad grande de Rubisco (del ingles: *Large Subunit*).

M: Hojas maduras.

ManI: alfa-manosidasa I, marcador del Aparato de Golgi.

N: Nitrógeno.

PBS: Buffer Fosfato Salino (del ingles: *Phosphate Buffer Saline*).

PCD: Muerte celular programada (del ingles: *Programmed Cell Death*).

PPasa: Pirofosfatasa (del ingles: *Pyrophosphatase*).

PsaA: Proteína del centro de reacción del Fotosistema I.

R6502: denominación comercial de bis-(benziloxicarbonil-Phe-Arg)-rodamina110, un sustrato de fluorescente de la proteasas cisteínicas. Invitrogen®.

RCB: Cuerpos contenedores de Rubisco (del ingles: *Rubisco Containing Bodies*).

ROS: Especies reactivas del Oxígeno (del ingles: *Reactive Oxygen Species*).

RTq-PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real cuantitativa (del ingles: *Real Time quantitative – Polymerase Chain Reaction*).

Rubisco: Ribulosa bífosfato Carboxilasa/Oxigenasa.

S: Hojas senescentes.

SAG: Genes asociados a la senescencia (del ingles: *Senescence Associated Genes*).

SDS-PAGE: Electroforesis en gel desnaturizante.

SPAD: colorímetro que permite estimar el contenido de clorofila en las hojas.

SSU: Subunidad pequeña de Rubisco (del ingles: *Small Subunit*)

TOR: Complejo regulador de autofágica y remobilización de N (del ingles: *Target of Rapamycin*).

v.g.: ejemplo (del latín: *verbi gratia*).

var: Variedad.

VAS: Vacuolas Asociadas a la Senescencia.

YFP: Proteína amarilla fluorescente (del ingles: *Yellow Fluorescent Protein*).

- **Unidades:**

μg: Microgramos.

μm: Micrómetros.

μM: Micromolar.

g: Gramos.

h: hora/s.

kDa: Kilo-Dalton, peso molecular.

M: Molar.

mg: Miligramos.

min: minutos.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

nm: Nanómetros.

p/v: peso/volumen.

ul: Microlitros.

v/v: volumen/volumen.

Introducción General

1- Introducción

1.1- El concepto de Senescencia.

En general, la senescencia puede ser definida como un proceso de degeneración de un organismo que conducirá a la muerte. Sin embargo, la senescencia en plantas se constituye como un conjunto de procesos complejos, poco delimitados en su alcance y en sus elementos intrínsecos. Esto tiene como consecuencia la aparición, en la literatura científica, de numerosas interpretaciones sobre el concepto de la senescencia. Así, el enfoque de los experimentos, los resultados y las interpretaciones son tan diversos como las concepciones que existen de la misma. Entonces resulta imprescindible realizar una revisión de estos conceptos para entender los antecedentes del tema e intentar interpretar los resultados expuestos en este trabajo en el contexto adecuado.

Una de las dificultades que se presenta al estudiar las bases fisiológicas y moleculares del ciclo de vida de las plantas o inclusive de alguno de sus órganos, es su variabilidad en la diversidad botánica. La longevidad de las plantas posee un rango con extremos importantes, como el de *Boerhavia repens* del desierto de Sahara con un ciclo de vida de 10 días, y en el otro extremo *Pinus longaeva* que alcanza los 4600 años, y algunos cultivares de propagación clonal que han sido recultivados durante 10.000 años. A esta complejidad se le suma la muerte inducida por factores y agentes externos como, excesiva irradiancia o (en el extremo opuesto) el sombreado intenso, deficiencias de nutrientes, temperatura sub o supraóptimas, fitopatógenos, herbívoros, etc.

Hay tres conceptos que están relacionados con la senescencia: la muerte celular programada, la apoptosis y el envejecimiento. Sin embargo las conexiones de estos conceptos con el de senescencia no son claras en la bibliografía. Ha habido numerosos intentos por esclarecer estos conceptos, pero la mayoría entra en contradicciones, reduccionismos, o basan sus criterios en parámetros poco definidos. Posiblemente, con el devenir de nuevos enfoques metodológicos estos conceptos puedan definirse apropiadamente.

Muerte celular programada (PCD), envejecimiento, apoptosis y senescencia.

Algo que si encuentra consenso, es la existencia de una secuencia de sucesos que, una vez inducida la degradación de componentes celulares (v.g., proteínas, ácidos nucleicos), lleva a la célula a un camino de autodestrucción organizada. Se refiere a este mecanismo como “muerte celular programada” o PCD (del ingles, Programmed Cell Death). El programa varía dependiendo del estímulo y del estado fisiológico de la célula/planta. van Doorn propone una clasificación de la PCD basada en cambios morfológicos: “autolítica”, definida por una rápida clarificación del citoplasma producto de la liberación de proteasas desde la vacuola central; y una “no autolítica” caracterizada por una degradación lenta del contenido citoplásmico. El primer mecanismo, posee un patrón similar a la autofagia en animales (como se describirá más adelante), aunque el autor desvincula esta interpretación dado que algunos datos indicarían que la autofagia retrasa el progreso de la PCD (van Doorn, 2011).

Otro concepto relacionado con fenómenos de deterioro, es el envejecimiento (en ingles: *aging*) el cual hace referencia a una degeneración progresiva de los mecanismos fisiológicos celulares a lo largo del tiempo. Esta noción de envejecimiento progresivo parece tener más relevancia en células animales que vegetales si consideramos la totipotencialidad de las últimas. La posibilidad de tomar una fracción de una planta y obtener de esta, otra planta completa, dificulta el empleo del concepto de envejecimiento. Las plantas, al constituirse como organismos modulares, podrían estar más afectadas por cuestiones arquitectónicas que temporales. La Gnetofita, *Welwitschia mirabilis* del desierto de Namibia, es un ejemplo extremo de esa interpretación. Sus dos únicas hojas presentan un crecimiento continuo, al mismo tiempo que sus extremos distales necrosan, llegando así a vivir hasta 2000 años. Quienes sostienen que el envejecimiento es clave en la funcionalidad de las células, emplean el ejemplo de la pérdida de viabilidad de las semillas para explicarlo, sin embargo, ese envejecimiento no es resultado de un mecanismo fisiológico. Posiblemente, el daño acumulado en el genoma a través del tiempo puede explicar, al menos parcialmente, este fenómeno en las semillas. Otro factor al cual se le atribuye el carácter de envejecer a las

células vegetales son las lesiones acumulables generadas por especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) a lo largo del tiempo (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Esta hipótesis no tiene en cuenta el complejo sistema de detoxificación de estas especies moleculares que los mantienen en niveles fisiológicos aptos y de los sistemas de reparación permanente de moléculas que han sido descritos en las células vegetales. Quizás, este factor sea importante cuando, como producto de un estímulo, la tasa de daño supere a la reparación, conduciendo a la PCD. El efecto de las especies moleculares reactivas sobre la degeneración celular no dependería del tiempo (envejecimiento) sino de estímulos cuya respuesta está programada (PCD). A pesar de que es difícil argumentar a favor de un factor etario que afecte a la senescencia en plantas, parece indudable que el nivel de respuesta a las fitohormonas si depende de la edad o al menos de su estado ontogenético que no es siempre dependiente del tiempo (Schippers, 2007).

Según la definición de Noodén & Leopold (1978), la senescencia es un proceso endógeno de degeneración que conduce a la muerte celular, destacando que no es un mero mecanismo pasivo que sucede en el tiempo. Sin embargo, se postula que el proceso de senescencia puede ser reversible hasta un punto denominado de “no retorno” y que este es bastante tardío en el proceso (Krul, *et al.*, 1974; Zabaleta-Mancera, 1999; van Doorn, 2005). El punto de “no retorno” podría superarse con la degradación de una cantidad de plástidos que impida la regeneración celular. Durante la PCD en hojas de *Perilla frutescens*, la síntesis de proteínas citoplásmicas inicialmente se mantiene constante, pero la síntesis de proteínas de los cloroplastos cesa. Esto ha sido asociado con la pérdida de actividad de la RNA polimerasa del cloroplasto (Carde, *et al.* 1988). Las células acompañantes del floema son una de las excepciones a esta hipótesis por carecer de plástidos, lo cual sugiere que en tales casos, un adecuado suministro de nutrientes externos permitiría a la célula continuar con sus funciones.

La senescencia es parte del ciclo de vida de las plantas superiores pero puede ejecutarse de manera diferente en células y/o tejidos, como así también en la planta completa. Los términos senescencia y PCD han sido usados frecuentemente de manera indistinta, sólo

determinado por la costumbre del uso en un grupo de investigación dado. Mientras que, como se mencionó arriba, la senescencia puede estudiarse a niveles celulares y supracelulares (incluso poblacionales), la PCD sólo puede ser definida en el marco del proceso de muerte citológica. Por esta razón, cuando se estudia la senescencia a nivel celular se puede hacer referencia a la PCD (van Doorn & Woltering, 2004) aunque no sean sinónimos o conceptos superponibles como se expondrá más adelante.

El concepto de apoptosis ha sido poco empleado para referirse a células vegetales dado que no se ha observado en plantas un proceso idéntico a la apoptosis de células animales (donde fue descripta por primera vez). Hasta ahora, la existencia de un proceso de apoptosis vegetal, basados en la definición animal de apoptosis, no ha sido convincentemente demostrado (Noodén & Guamet, 1996; Yamada *et al.*, 2003; Hoeberichts *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2009). La apoptosis en animales está definida por tres caracteres morfológicos: fragmentación nuclear, formación de “cuerpos apoptóticos” y fagocitosis de esos cuerpos apoptóticos por otras células (ejemplo: macrófagos) (Baehrecke, 2003). Teniendo en cuenta la presencia de la pared celular, la posibilidad de que los dos últimos procesos ocurran en células vegetales es nula. Sin embargo, varias características asociadas a la apoptosis animal son compartidas con las células vegetales: el papel de las proteasas del tipo caspasas, la condensación de la cromatina, vesiculación del núcleo y degradación del ADN (van Doorn & Woltering, 2005). En este sentido, se ha tratado a la apoptosis como un tipo de PCD, definiéndose en plantas como una “PCD del tipo apoptosis” (Reape & McCabe, 2008). Se podría considerar, en un sentido amplio, que la apoptosis es la última etapa de la senescencia donde la degradación se produce de manera inespecífica y conlleva a la necrosis tisular. Entonces la apoptosis, se diferenciaría de la etapa anterior, donde ocurre una degradación parcial y organizada tendiente al desmantelamiento de cloroplastos y mitocondrias (ver “Fase Degenerativa” y “Terminal” en la Fig. 1).

La senescencia foliar

La senescencia de las hojas se caracteriza por la caída de la tasa de fotosíntesis, desintegración de la estructura de las organelas, pérdida de clorofila y proteínas, daño oxidativo acumulativo, incremento de la actividad proteolítica y de poligalacturonasas, aparición de estructuras de autofagia, permeabilización de las membranas y pérdida de estructura tisular normal (Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997; Yamada *et al* 2003; Hoeberichts *et al.*, 2005; Shibuya *et al.*, 2009). Los cambios enumerados son sólo algunos de los más evidentes síntomas de la senescencia foliar y la manifestación de estos cambios depende del estímulo que prevalece y del estado fisiológico de la célula/planta. Hasta ahora, no es posible definir clara e inequívocamente los cambios bioquímicos que ocurren durante la senescencia. Las características más evidentes son la pérdida de clorofila y proteínas de los cloroplastos, aunque estas son sólo consecuencias del desmantelamiento de los cloroplastos, que no siempre está asociado a la senescencia y que sólo ocurre en órganos fotosintéticos. A la senescencia no se la podría caracterizar por tal o cual síntoma, sino que debe considerarse como un síndrome (Noodén, 2004), es decir como un conjunto de síntomas que conducen a una desmantelamiento celular relativamente regulada (Fig. 1).

Los factores que pueden desencadenar la senescencia foliar son diversos. Sólo como ejemplos se pueden nombrar los hormonales, el estrés biótico y abiótico, e inducidos por oscuridad, por corte o hambreado (*v.g.* deficiencia en Nitrógeno). Se han realizados varios estudios transcriptómicos y proteómicos tratando de dilucidar el o los mecanismos que disparan la senescencia (Bhalerao *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Schiltz *et al.*, 2004; Gregersen & Holm, 2007; Desclos *et al.*, 2004; Breeze, *et al.*, 2011). Como conclusión general de la interpretación de esos datos, se postula que existen diferencias significativas en los perfiles de respuestas a la senescencia natural e inducida en las primeras etapas, pero que luego las señales se integran para desencadenar el proceso de la senescencia (Guo, 2012).

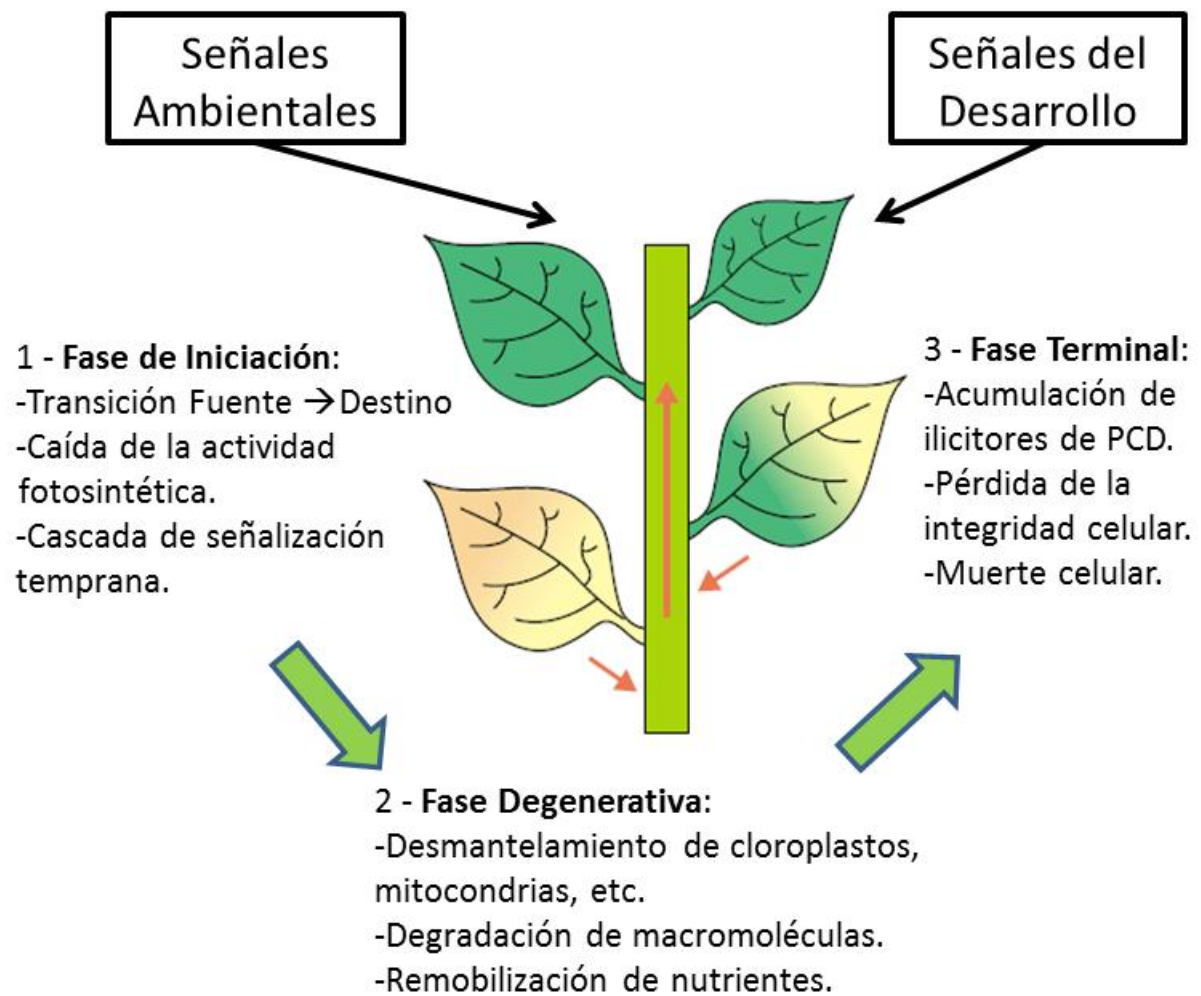


Figura 1: Los tres estados de la senescencia foliar y sus características fisiológicas. La senescencia es inducida por factores ambientales (externos) o del desarrollo (internos). Las hojas inferiores se encuentran en un estado más senescente que las hojas superiores (senescencia secuencial). Las flechas rojas señalan la retranslocación de nutrientes. Adaptado de Yoshida 2003.

1.2- Procesos principales que participan en la senescencia.

Si no es un herbívoro, un patógeno o la escasez de un nutriente el cual precipite la senescencia, al cabo de un tiempo inevitablemente se desencadenan una serie de procesos que terminan con la muerte de la planta. En las especies monocárpicas, estos procesos son claramente iniciados por el desarrollo de las estructuras reproductivas que se vuelven en el

sumidero más importante para distintas moléculas e iones removilizados desde los órganos vegetativos (Noodén, 1988). A continuación se describirán los procesos principales que ocurren durante la senescencia y que de manera variable, según sea el caso, contribuyen a su modulación.

1.2.1 Procesos Oxidativos.

El papel que tienen las especies moleculares reactivas en la senescencia no está claro, aunque se está seguro de que tienen un rol importante. La principal fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*) en tejidos fotosintéticos son los cloroplastos (Quirino *et al.*, 2000) por lo que no es difícil pensar que las ROS participan en el desmantelamiento de este orgánulo. En tabaco, la anulación del gen cloroplástico *ndhF*, componente de la cadena transportadora cíclica de electrones y fuente de ROS, retrasa la senescencia de las hojas (Zapata, *et al.* 2005). Varios mutantes que muestran senescencia retrasada poseen también tolerancia al estrés oxidativo, lo cual sugiere la existencia de una atenuación de los efectos de las ROS (Woo, *et al.* 2004).

Además de actuar directamente, las ROS, podrían facilitar los procesos de degradación. La inducción exógena de la producción de ROS en cloroplastos de cebada estimula la asociación de Rubisco con la fracción insoluble de los cloroplastos y la degradación parcial de la subunidad grande de Rubisco (LSU, del inglés: *Large Subunit*) (Desimone, *et al.* 1996; Simova-Stoilova, *et al.* 2002).

Durante la senescencia, el incremento de los niveles de radicales libres, no sólo es causado por el aumento de su producción, sino también de la disminución de la capacidad antioxidante (Zimmermann & Zentgraf, 2005). Durante la senescencia de hojas de arveja, los peroxisomas tienen un incremento de la actividad de la superóxido dismutasa, pero decrece la actividad de la catalasa (Pastori & del Río, 1997). El incremento de la concentración de peróxido de hidrógeno y de los aniones superóxido en el inicio de la senescencia podrían condicionar la capacidad fotosintética del tejido (Niewiadomska *et al.*, 2008). El incremento de

las ROS durante la senescencia, especialmente del peróxido de hidrógeno, sugiere que podrían actuar directamente en la oxidación de la maquinaria fotosintética y/o como señal de inducción de genes asociados a la PCD (Noodén, *et al.*, 2004).

1.2.2 - Flujo Metabólico.

En general, una de las características más evidentes de la senescencia es la predominancia de las vías catabólicas del metabolismo, en especial la degradación de las proteínas de los cloroplastos. Este proceso incluye, tardíamente, la degradación de membranas internas y clorofilas (Sakamoto, 2006; Horstensteiner, 2006). Durante la senescencia, el número de genes implicados en el catabolismo sobre-expresados representa a casi el doble de los genes relacionados con el anabolismo (Guo *et al.*, 2004).

El balance entre el contenido de Carbono (C) y Nitrógeno (N) parece ser clave en la inducción de la senescencia (Martin, *et al.*, 2002; Guiboileau *et al.*, 2010). La acumulación de azúcares en las hojas puede disparar la senescencia, aunque también hay datos que apuntan en el sentido contrario dependiendo de la especie (van Doorn, 2008). En hojas de *Arabidopsis*, la senescencia puede ser inducida por un aumento de la concentración de glucosa pero sólo si es acompañado con baja concentración de nitrógeno (Wingler *et al.*, 2004). En muchos casos, como se dijo al principio, los resultados experimentales dependen del modelo de estudio, así, en hojas separadas de la planta e incubadas en la oscuridad, la senescencia tiene como consecuencia el aumento de la concentración de hexosas (Krapp *et al.*, 1991), pero en hojas inducidas a senescer en la planta, se registra una disminución del contenido de hexosas. Este comportamiento podría entenderse considerando la removilización de nutrientes como parte integral del proceso de la senescencia. El bloqueo experimental de la exportación a través del floema, mediante el descortezamiento anular o el “anillado” en la base del peciolo de una hoja unida a la planta, tiene como resultado la misma respuesta obtenida en una hoja separada de la planta, i.e., acumulación de azúcares y aceleración de la senescencia (Parrot, *et al.*, 2005).

Es posible que niveles altos de azúcares tiendan a regular negativamente la fotosíntesis, debido a un control de tipo *feedback* negativo, si se consideran las causas nutricionales de la senescencia foliar (Wingler *et al.*, 2009). La actividad de la Hexoquinasa, enzima clave en el metabolismo de hexosas, parece estar involucrada en esta regulación. La sobre-expresión de la Hexoquinasa produce hipersensibilidad a la glucosa (Dai *et al.*, 1999) y su versión mutada, *gin2*, muestra una senescencia retrasada. La Hexoquinasa I (HXK1), también es parte de un complejo de proteínas en el núcleo que controla la transcripción y la degradación mediada por proteosoma de EIN3, un factor transcripcional clave en la señalización del etileno (Rolland *et al.*, 2006). El mecanismo de señalización en el que intervienen los azúcares parece estar modulado por factores externos, como la irradiancia y el balance entre CO₂ y O₂ (Wingler *et al.*, 2006, Fig. 2).

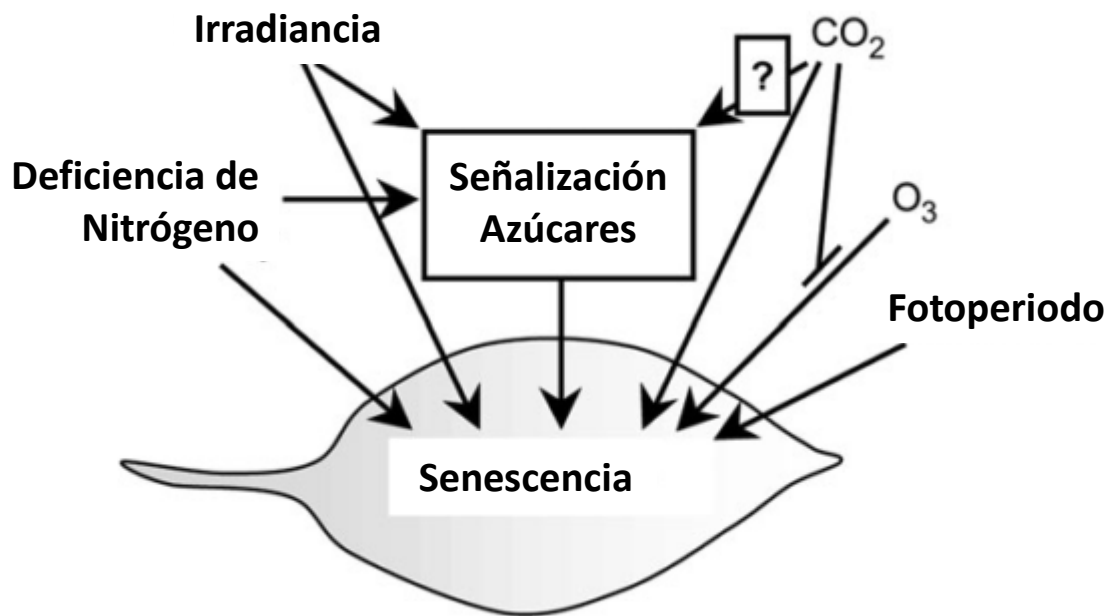


Figura 2: Principales factores asociados al metabolismo que modulan la senescencia. Traducido de Wingler *et al.*, 2006. Journal Experimental Botany.

Es interesante notar el efecto que tienen los azúcares en la autofagia, un proceso clave en la senescencia (Aubert *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003). Mutaciones en varios de los genes necesarios para el desarrollo de la autofagia, resultan en plantas con senescencia temprana (Doelling *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005). Sin embargo, la glucosa no induce la expresión de genes de autofagia en condiciones de alto contenido en nitrógeno, indicando nuevamente que el balance C/N podría tener un rol importante también en la inducción de la autofagia.

1.2.3 – Regulación hormonal.

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos orgánicos naturales que tienen influencia en numerosos procesos fisiológicos de las plantas, incluyendo el inicio y el ritmo de la senescencia (Noodén & Leopold, 1988). La acción de las fitohormonas es compleja y es el resultado de la interacción con estímulos ambientales, señales metabólicas y con otras hormonas de la planta. En relación a la senescencia, las hormonas más destacadas son las citocininas y el etileno. El efecto que producen estas hormonas está bastante conservado en el reino vegetal, aunque existen algunos ejemplos de variaciones dependiendo de la especie. Además, se conoce que los jasmonatos, ácido salicílico, auxinas, ácidos abscísico y giberelinas, también tienen efectos en el proceso de senescencia (Fig. 3).

Las citocininas son el grupo de hormonas más activo retardando e incluso revirtiendo el síndrome de la senescencia. Esta acción fue reportada por primera vez por Richmond & Land en 1957 al observar que la aplicación exógena de citocininas podía revertir el “amarillamiento” de las hojas. Las citocininas actúan como moduladoras en la división celular, proliferación de yemas axilares, formación de órganos *in vitro*, desarrollo de cloroplastos y floración. Su participación como regulador negativo de la senescencia se confirmó directamente con la construcción de una planta transgénica que expresaba el gen de la enzima bacteriana Isopentenil Transferasa (ipt) bajo el control del promotor del gen SAG12, un gen cuya expresión es específica de la senescencia (Gan & Amasino, 1995). La enzima IPT es clave en la síntesis de citocininas en las plantas. Cuando se inducía la senescencia en estas

plantas se activaba el promotor de SAG12, sintetizando IPT. Esta estrategia produjo un incremento autorregulado de la producción de citocininas y, por lo tanto, un retraso en la senescencia foliar, manteniendo a la planta fotosintéticamente activa durante más tiempo en comparación con el genotipo silvestre (Jordi *et al.*, 2001). A nivel genético, las citocininas inducen la expresión de proteínas ribosomales (Crowell *et al.*, 1990) y de genes de proteínas fotosintéticas (Mok & Mok, 2001) estimulando la fase fotosintéticamente activa de las hojas.

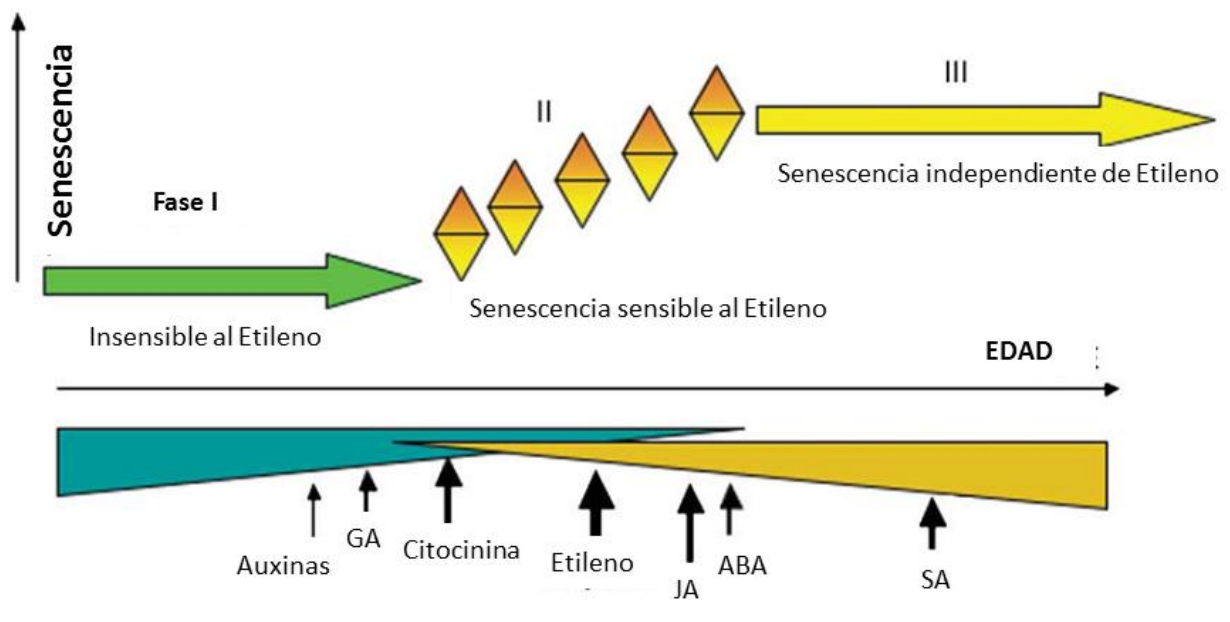


Figura 3: Efecto de las fitohormonas en la senescencia. Durante el desarrollo temprano de la planta, no es sensible al Etileno (fase I), luego, una vez madura se vuelve sensible al Etileno y acelera la senescencia (fase II), finalmente la senescencia continúa su transcurso independientemente de la hormona (fase III). La acción de hormonas que inhiben la senescencia disminuye con la edad de la hoja (triángulo azul) mientras que las hormonas que promueven la senescencia incrementan su efecto (triángulo amarillo). Adaptado de Jing *et al.*, 2002 y Schippers 2007.

El Etileno es esencial para la maduración de los frutos climatéricos y tiene un importante papel en la senescencia de las hojas, con efectos antagónicos a las citocininas. Se trata de la única hormona vegetal que se presenta en forma de gas, lo cual le permite difundir fácilmente por los espacios intercelulares y coordinar una respuesta rápida y uniforme en los

tejidos. El etileno aplicado exógenamente en hojas maduras, induce la senescencia en la mayoría de las especies aunque no tiene efecto si la aplicación es sobre hojas jóvenes (Fig. 2).

En *arabidopsis*, las mutaciones en la vía de señalización del etileno confirman que esta hormona tiene el efecto de promover en lugar de iniciar la senescencia (Jing *et al.*, 2002). Todo indica que el etileno sería un modulador de la senescencia junto con su antagonista, las citocininas. El efecto de esta hormona sobre el metabolismo celular no es del todo conocido, pero se lo asocia, entre otras cosas, al aumento de la actividad de proteasas. Posiblemente, la enzima clave de la síntesis del etileno, la ACC sintasa (por el precursor ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico, o ACC) sea blanco de factores moduladores de la senescencia.

Los giberelinas (GA) son diterpenos tetracíclicos que promueven el desarrollo de tallos y hojas en plantas. Las giberelinas participan en la germinación de las semillas, la estimulación del crecimiento del tallo, la inducción de la partenocarpia (desarrollo de frutos no fecundados) y la síntesis de enzimas hidrolíticas durante la germinación de cereales. La primera relación con la senescencia fue reportada por Fletcher & Osborne en 1965, mostrando que el GA retarda la senescencia de hojas cortadas de *Taraxacum officinale*. La cantidad de GA en la planta, se reduce gradualmente hasta que, en la senescencia, desaparece por completo. Esto puede ser causado por la conversión de GA libre a un glucósido inactivo. Mutaciones en genes que controlan la biosíntesis y señalización de GA no tienen efectos importantes en el proceso de la senescencia por lo que no es claro su papel y esta área requiere mayores estudios.

Las auxinas son un grupo heterogéneo de moléculas con propiedades también diversas. Se las asocia en general con la división, crecimiento y diferenciación de células vegetales. Las más reconocidas por su importancia económica son el ácido indolacético (AIA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Algunos de sus efectos en las células están relacionados con el ablandamiento o relajación de la pared celular. La diversidad de respuestas que generan es reflejo de la existencia de múltiples mecanismos de recepción de

auxinas y de su transducción (Leyser *et al.*, 2002). El tratamiento con auxinas de hojas separadas de la planta, produce una disminución de la expresión del gen SAG12 (Noh & Amasino, 1999). Tanto las citocininas como las auxinas son importantes en la regulación del estado nutricional de la planta a través de la vía de señalización de la Hexoquinasa 1 (Moore *et al.*, 2003). El efecto de esta vía de regulación está asociado con la concentración de Glucosa y la fotorespiración, los cuales pueden tener una participación importante en la primera etapa de la senescencia.

El ácido abscísico (ABA) es un regulador del desarrollo que se presenta en casi todos los tejidos de las plantas. Está asociado a la respuesta al estrés y al desarrollo de semillas. En tejidos vegetativos, interviene en el control del cierre estomático y mantiene el estado vegetativo al inhibir el desarrollo de estructuras reproductivas. Las hojas de plantas sometidas a estrés por deshidratación, salino y por frío, tienen un incremento significativo de ABA (Xiong & Zhu, 2003). La aplicación de ABA a hojas separadas de la planta acelera la senescencia, aunque en la aplicación en hojas unidas a la planta la respuesta no es evidente. En condiciones óptimas de nitrógeno y altas concentraciones de azúcares, el mutante *abi5* (deficiente en un intermediario de la señalización de ABA) presentó senescencia retrasada. Esto es consistente con el rol de los azúcares durante la senescencia foliar. La expresión de *ABI5* se incrementa durante la senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), y las enzimas que controlan la síntesis de ABA se expresan fuertemente. Esto sugiere que las vías de señalización y biosíntesis de ABA son activas durante la senescencia. Los mutantes que no sintetizan ABA o los que son insensibles ABA, también son insensibles al tratamiento con glucosa (Arenas-Huertero *et al.*, 2000) y dado que un aumento de azúcares induce la supresión de genes asociados a la fotosíntesis, eventualmente esto podría conducir a la senescencia foliar. En general, la respuesta a ABA parece estar asociada a cambios del flujo metabólico que podrían desencadenar un proceso degradativo, tendiente a la removilización de nutrientes. Sin embargo, recientes estudios atribuyen esta respuesta a las semillas pero no a las hojas (Purteau, *et al.*, 2004).

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas esteroides poli-hidroxiladas que regulan el crecimiento y la diferenciación de las plantas a través de todo el ciclo vital. La aplicación de esta hormona sobre hojas unidas a la planta provoca una aceleración de la senescencia, aunque esta respuesta no se ha registrado en *arabidopsis*. Posiblemente el efectos de los brasinoesteroides esté relacionado con la inducción del estrés oxidativo (Clouse & Sasse, 1998). Mutantes de la biosíntesis y señalización de los BR sugieren un papel directo de esta hormona en la senescencia (Chory *et al.*, 1991; Kieber *et al.*, 1993; Yin *et al.*, 2002). Sin embargo, los datos de transcriptómica no respaldan esta relación, atribuyendo los efectos de los BR a relaciones indirectas (Guo, *et al.*, 2004).

Los jasmonatos (JA) son fitohormonas derivadas del ácido linoléico y participan en la respuesta a estrés abiótico y biótico. Incluye al ácido jasmónico, metil jasmonato y compuestos relacionados. Sus funciones son diversas: desarrollo de semillas, órganos vegetativos y floración, tuberización, maduración de semillas, enrollamiento de zarcillos y senescencia foliar (Wasternack and Hause, 2002). La aplicación exógena de JA conduce a la estimulación de la senescencia foliar controlando la expresión de importantes genes de la fotosíntesis. La proteína COI1 (del inglés, *coronative insensitive 1*) es un receptor de JA. Luego del tratamiento con JA de hojas de *arabidopsis*, estas aceleran su senescencia, pero esto no ocurre cuando se realiza la misma aplicación en el mutante de *coi1* (He *et al.*, 2002). Se encontró que los niveles de la proteína Rubisco Activasa (RCA), esencial para el funcionamiento de Rubisco, disminuyen en hojas tratadas con JA. En los mutantes *coi1* el tratamiento con JA no modificó la abundancia de RCA, implicando al receptor COI1 en esta represión. La mutación en el gen de la RCA condujo a síntomas similares al tratamiento con JA (Shan *et al.*, 2011): pérdida de clorofilas y proteínas e inducción de genes asociados a la senescencia.

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico que ha sido identificado como un componente clave en la señalización de numerosas respuestas de las plantas al estrés, incluyendo aquellos causados por agentes bióticos (Glazebrook, 1999) y abióticos como la

exposición a ozono y radiación UV-B (Rao & Davis, 1999; Surplus *et al.*, 1998). El SA tiene como efecto celular más evidente el aumento de los niveles de H_2O_2 y esto se debe al incremento de la actividad de la Superóxido dismutasa. Tratamientos prolongados pueden ocasionar la inactivación de las enzimas en la vía de detoxificación del superóxido, determinando que el contenido de H_2O_2 aumente ocasionando estrés oxidativo (Rao *et al.*, 1997). Los mutantes de la cascada de señalización de SA, *nahG*, *pad4* y *npr1*, muestran una expresión alterada de algunos genes asociados a la senescencia. La expresión de *SAG12* es condicionada en presencia de SA (Morris, *et al.*, 2000).

1.2.4 – Autofagia

La autofagia es un mecanismo bastante conservado en las células eucariotas para la degradación de proteínas y estructuras celulares. La autofagia está implicada en varios procesos fisiológicos el desarrollo de la semilla, germinación, fotomorfogénesis, maduración y reparación de cloroplastos, nutrición mineral, respuesta a hormonas, resistencia a patógenos y varios tipos de PCD. Se han propuesto dos clases de autofagia: la microautofagia, que consiste en la invaginación del tonoplasto incluyendo pequeñas fracciones del citoplasma; y la macroautofagia, que involucra vesículas provenientes, presumiblemente, del Retículo Endoplásmico o del Aparato de Golgi que rodean una fracción de citoplasma, pudiendo contener orgánulos completos, y los transporta a la Vacuola Central para ser degradados. Recientemente se ha descrito un tercer tipo de autofagia denominada “autofagia mediada por chaperonas” pero su presencia en las células vegetales aún no ha sido determinada (Rabinowitz & White, 2010). Las vesículas de la macroautofagia provenientes del retículo o del Golgi, se denominan fagóforos y luego, cuando encierran una porción de citoplasma formando una vesícula de dos membranas constituyen los autofagosomas. El autofagosoma transporta su contenido hasta la vacuola central para volcar su contenido en ella mediante la fusión de la membrana externa del autofagosoma con al tonoplasto. La vesícula remanente, de una membrana, se denomina cuerpo autofágico que por acción de lipasas y proteasas es degradada dentro de la Vacuola Central. Este esquema general o canónico de la autofagia fue

descrito en detalles en las células de levaduras (*Saccaromyces cerevisiae*). En plantas se han hallado estructuras semejantes, observadas mediante microscopía de transmisión y de fluorescencia que sugieren la existencia de un mecanismo de autofagia (Moriyasu & Klionsky, 2004). En levaduras se han encontrado alrededor de 31 genes involucrados directamente en la autofagia, de los cuales 24 ortólogos de estos genes también se hallaron en *Arabidopsis thaliana*. Esta lista incluye al regulador negativo de la autofagia TOR (del inglés, *Target of Rapamycin*), los componentes del complejo quinasa ATG1-ATG13 (del inglés, *AUTOPHAGY*), parte del complejo VPS34-PI3K (involucrados en la incorporación del autofagosoma a la vacuola central), la cascada de transducción de ATG8-ATG12, ATG9, y varias subunidades del sistema de reconocimiento VT11 v-SNARE. En las plantas, el mecanismo adoptó mayor complejidad y eso lo demuestran las enormes familias de genes que codifican para varias de las proteínas involucradas en la autofagia. Por ejemplo, la familia de genes de ATG8 posee al menos nueve miembros activos o isoformas, los cuales poseen modificaciones que indicarían la interacción con diferentes factores (Yoshimoto *et al.*, 2004). En plantas, se han encontrado isoformas estructuralmente distintas de los genes de autofagia de animales y levaduras que sugieren la existencia de vías autofágicas específicas de plantas (Suttangkakul *et al.*, 2011).

Recientemente, la noción de autofagia ha cambiado desde un concepto restringido a la degradación en masa e inespecífica de los componentes celulares a una definición más amplia y compleja que describe a la autofagia como un mecanismo flexible y multifuncional. Esta interpretación de la autofagia se refleja en el estudio de recientes mecanismos de degradación como la mitofagia, pexofagia, ribofagia y clorofagia (Li & Vierstra, 2012; Liu & Bassham, 2012)

.

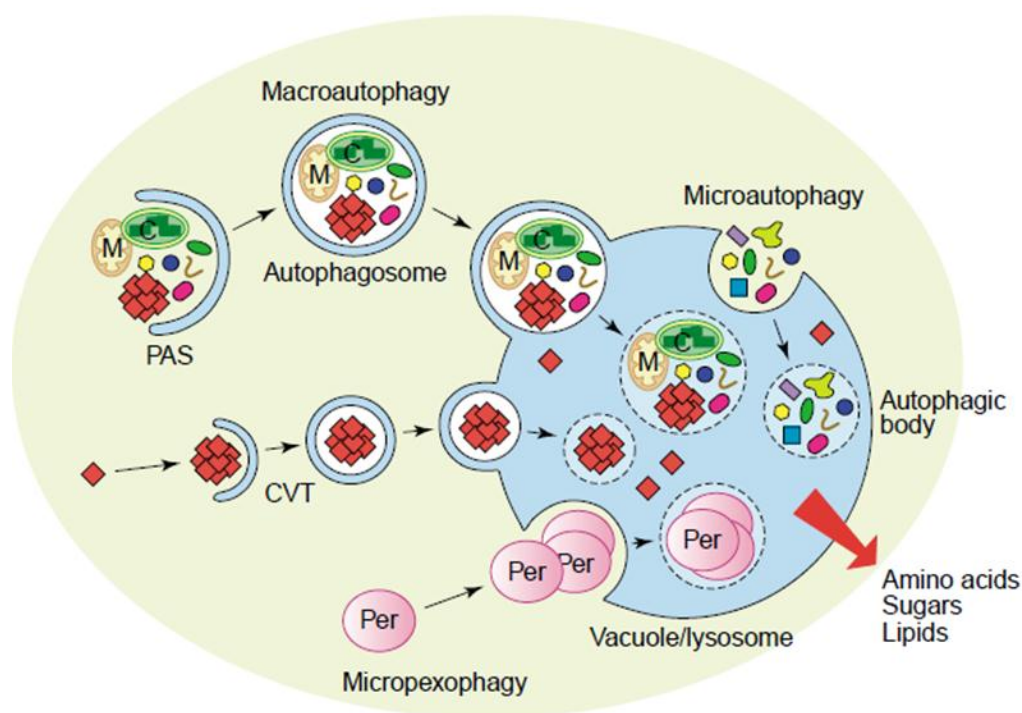


Figura 4: Esquema de los mecanismos de autofagia más conocidos en células eucariotas. La microautofagia y la micropexofagia ocurren por la invaginación del tonoplasto para encerrar una porción de citoplasma o peroxisomas (Per) y así crear cuerpos autofágicos en la vacuola. La macroautofagia y la CVT (del inglés, *Cytoplasm to Vacuole Transport*), consisten en secuestrar componentes del citoplasma en vesículas de doble membrana y transportarlos a la vacuola central. Los cuerpos autofágicos son degradados por la vacuola central y los metabolitos exportados. Thompson & Vierstra, 2005.

1.2.3 – Degradación de Componentes Fotosintéticos

La degradación de las proteínas fotosintéticas constituye la primera etapa evidente del proceso de senescencia, incluso comienza antes que la pérdida de clorofilas en el “amarillamiento” de las hojas. Los cloroplastos muestran importantes cambios ultraestructurales, como ha sido determinado mediante microscopia electrónica. Las principales características que presentan los cloroplastos de hojas senescentes son: reducción del sistema de membranas tilacoidales, pérdida de la estructura en grana, contracción del tamaño, transición de una forma ovoidea a una forma esferoidal cóncava y la aparición de

numerosas estructuras osmiófilas denominadas plasto-glóbulos (Noodén, 1988; Guamet *et al.*, 1999; Matile, 1992; Inada *et al.*, 1998).

Los cloroplastos son el reservorio de nutrientes más importante en las plantas superiores (Peoples & Dalling, 1988). Durante el desmantelamiento del aparato fotosintético, sus componentes son degradados y exportados a otras partes de la planta (Feller & Fischer, 1994). Las proteínas maduras de los plástidos en órganos vegetativas (v.g., hojas) son degradadas y los aminoácidos resultantes exportados, por ejemplo, a las semillas en desarrollo (Noodén *et al.*, 1997). El desmantelamiento de los cloroplastos conduce a la pérdida de funcionalidad celular, la caída de la actividad fotosintética, y en algunos casos a la muerte de la misma.

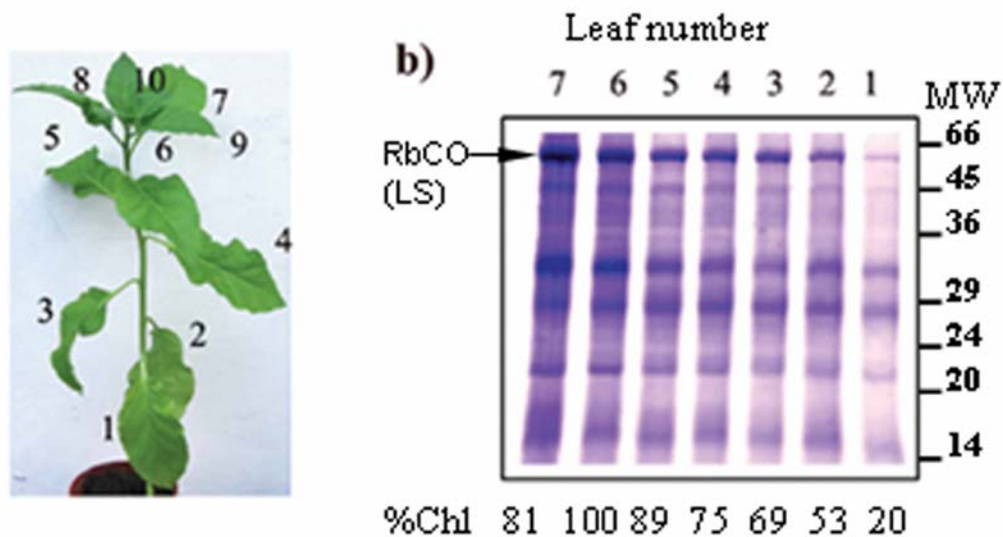


Figura 6: Contenido de proteínas y clorofila en hojas de progresivamente más senescentes en *Nicotiana tabacum*. En la foto de la izquierda, un planta de tabaco con las hojas numeradas desde hojas más senescentes (1) hasta las maduras (7). Tomado de Martínez & Costa *et al.*, 2008.

La enzima Ribulosa-1,5-bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (Rubisco) es la proteína más abundante en las plantas e incluso podría ser considerada también como la proteína más abundante del planeta (Ellis, 1979). En las plantas, con metabolismo fotosintético C₃, Rubisco

constituye entre el 50 y el 70% del contenido en proteínas solubles representando el 30% del nitrógeno foliar (Spreitzer & Salvucci, 2002; Makino, 2003). El Nitrógeno remobilizado desde Rubisco durante la degradación de las hojas más viejas puede ser translocado a las hojas nuevas o a los frutos en desarrollo.

Las ROS podrían estar involucradas directamente en este proceso, dado que *in vitro* pueden hidrolizar a la subunidad grande de Rubisco (LSU, del ingles *Large Subunit*) o por modificaciones de la proteína para volverla susceptible de degradación por parte de proteasas (Desimone *et al.*, 1996; Roulin & Feller, 1998). Numerosas exo- y endo-peptidasas han sido encontradas en plástidos (Adam & Clarke, 2002) y podrían participar en la degradación de componentes de los cloroplastos durante la senescencia. Una de esas proteasas, del tipo de las metalo-proteasas, es capaz de degradar parcialmente a LSU *in vitro* (Bushnell *et al.*, 1993). También, en el cloroplasto se detectó la actividad de una proteasa aspártica con sitio de unión ADN que podría tener un rol importante en la senescencia durante la removilización de nitrógeno desde la Rubisco (Kato *et al.*, 2004). En hojas senescentes, se han encontrado evidencias de que numerosas proteasas de las familias de Clp, FtsH y DegP son expresadas y localizadas en los cloroplastos (Andersson *et al.*, 2004; Gepstein *et al.*, 2003; Schiltz *et al.*, 2008; Desclos *et al.*, 2009).

1.2.3.1 – Degradación extra-plastidial de componentes fotosintéticos.

Es posible que no sólo las enzimas localizadas dentro de los cloroplastos sean las responsables de la degradación de Rubisco (Guamet *et al.*, 1999; Thoenen *et al.*, 2007). Por ejemplo, en incubaciones de extracto crudo de hojas de tabaco senescente, aparece la LSU de Rubisco hidrolizada, pero esto no ocurre cuando se incuban sólo cloroplastos aislados (Miyadai *et al.*, 1990). Esto sugiere que la salida de LSU del cloroplasto sería esencial para su degradación.

La hidrólisis de Rubisco es inhibida cuando el extracto de hoja es pre-incubado con E-64, un inhibidor de las proteasas cisteínicas (Zhang *et al.*, 2006). Parece probable que la

hidrólisis extraplastidial de componentes cloroplásticos tenga lugar en la vacuola central principalmente mediante proteasas cisteínicas y que en los cloroplastos aislados actúen otro tipo de hidrolasas (metalopeptidasas y proteasas aspárticas) acompañado por la acción directa o indirecta de las ROS (Feller *et al.*, 2008). La vacuola central es una de las candidatas más claras para la degradación de los componentes de los cloroplastos y otros orgánulos por ser el compartimiento lítico más grande de las células maduras (De, 2000).

En células de tabaco sometidas a la privación de nutrientes, el tratamiento con el inhibidor de proteasas cisteínicas E-64, determina la aparición de vesículas de entre 1 y 6 μm en el citoplasma (Moriyasu & Ohsumi, 1996). El empleo de quinacrida y la tinción con rojo neutro, mostró que estas vesículas eran más ácidas que la vacuola central. Mediante un método citoquímico se demostró la presencia de la actividad de la enzima Fosfatasa Ácida en la membrana de estas vesículas. La identidad de estas vesículas ácidas y con actividad de la Fosfatasa ácida, correspondería a estructuras autofágicas observadas en levaduras y células animales (Takatsuka *et al.*, 2011). La autofagia es conocida por ser el mayor sistema para la degradación de proteínas intracelulares y de organelas en levaduras y plantas, o en lisosomas en animales (Bassham *et al.*, 2006). Usando mutantes de genes de autofagia y un sistema de monitoreo con un marcador de autofagia, GFP-ATG8, se han realizado numerosos estudios que demuestran la presencia del sistema de autofagia en plantas asociado a la senescencia (Thompson *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008).

En hojas senescentes de soja, se registró la presencia de estructuras globulares denominadas “plasto-glóbulos” que parecen protruir desde los cloroplastos (Guamet *et al.*, 1999). Los plasto-glóbulos están compuestos por lípidos y proteínas del cloroplasto. Por microscopía de fluorescencia se detectó que también poseen clorofila y/o metabolitos de clorofilas. Estas estructuras no fueron detectadas en un genotipo “Stay Green” de soja (genotipo: GGd1d1d2d2), lo cual sugiere que esos plasto-glóbulos están relacionados con la degradación de los cloroplastos durante la senescencia foliar.

Estructuras similares de entre 0,4 y 1,2 μm de diámetro, fueron encontradas en hojas senescentes de trigo. A estas vesículas, posiblemente de doble membrana, se las denominó “cuerpos contenedores de Rubisco” (en ingles, *Rubisco Containing Bodies*, RCBs) por haberse detectado en su interior a la subunidad grande de Rubisco (Chiba *et al.*, 2003). Además se encontró que contienen Glutamina sintetasa cloroplástica, aunque no se detectó fluorescencia de clorofilas. Pruebas morfológicas y moleculares indican que las RCBs corresponderían a estructuras autofágicas del tipo autofagosoma o “autolisosoma”. Mediante el tratamiento con concanamicina A, un inhibidor de la ATPasa vacuolar, las RCBs fueron detectadas en la vacuola central (Wada *et al.*, 2009, Ishida *et al.*, 2008), con lo cual se establece una posible conexión entre los cloroplastos y la vacuola central.

Es evidente la ocurrencia de vesículas extra-plastidiales que participan en la degradación de componentes cloroplásticos durante la senescencia, sin embargo este mecanismo no sería exclusivo de la senescencia. Se han encontrado estructuras similares en células de hojas jóvenes de tabaco que fueron denominadas “cuerpos vesiculares de Rubisco” (en ingles, *Rubisco Vesicular Bodies*, RVBs). Fueron observadas tanto en plantas de tabaco salvaje como en tabacos que expresan en el citosol el inhibidor de proteasas cisteínicas OC-1 proveniente de arroz (Prins *et al.*, 2008). Esto podría sugerir que el mecanismo extra-plastidial de degradación de componentes cloroplásticos no es exclusivo de la senescencia o de la respuesta al estrés, sino también, del proceso de reciclado de proteínas basal durante todo el ciclo de vida de la planta.

1.3 – Vacuolas Asociadas a la Senescencia (VAS).

Las Vacuolas Asociadas a la Senescencia (VAS) son un tipo específico de vacuolas que están involucradas en la degradación de algunos componentes del aparato fotosintético durante la senescencia de las hojas (Otegui *et al.*, 2005; Martínez & Costa *et al.*, 2008). Estas vacuolas se caracterizan por ser pequeñas, de 0.5 a 1 μm de diámetro, tener un lumen más ácido ($\text{pH}= 5.2$) que la Vacuola Central ($\text{pH}= 6$), poseer actividad proteolítica y una composición en proteínas que la diferencia de los demás compartimientos celulares (Fig. 7). Se presentan en células fotosintéticas del mesófilo y células oclusivas del estoma de hojas durante la senescencia natural o inducida (por etefón y/o en hojas cortadas e incubadas en oscuridad) de *Arabidopsis*, soja (Otegui, *et al.*, 2005) y tabaco (Martínez & Costa, *et al.*, 2008).

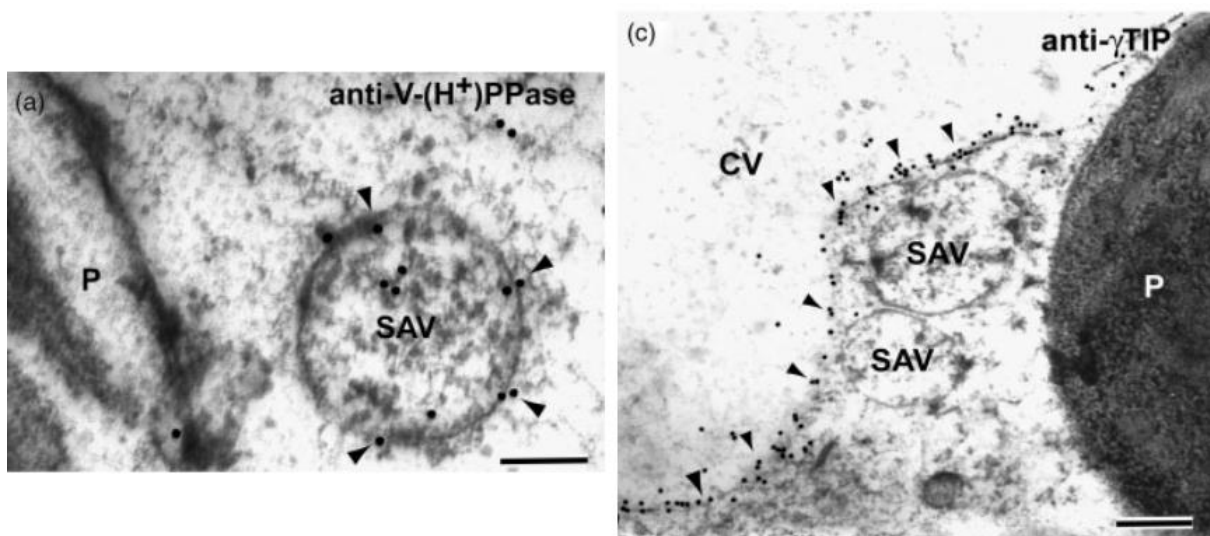


Figura 7: Inmunolocalización de pirofosfatasa en VAS (izquierda) y gamma-TIP en tonoplasto (derecha). Barra: 250 nm. Tomado de Otegui, *et al.*, 2005.

Las VAS poseen una intensa actividad proteolítica, como se demostró empleando R6502 y R6505, dos fluoróforos que se activan por hidrólisis mediada por proteasas cisteínicas y serínicas respectivamente (Otegui *et al.*, 2005). Entre las proteasas cisteínicas localizadas en las VAS se encuentra SAG12. La expresión de SAG12 es uno de los marcadores de la senescencia más empleado en estos estudios, por poseer una ventana de expresión bastante estrecha en la fase tardía de la senescencia. Mediante la construcción de una planta que expresa SAG12 fusionada a GFP bajo el promotor de SAG12, se logró determinar que esta proteasa se localiza en las VAS de *Arabidopsis thaliana* (Otegui *et al.*, 2005).

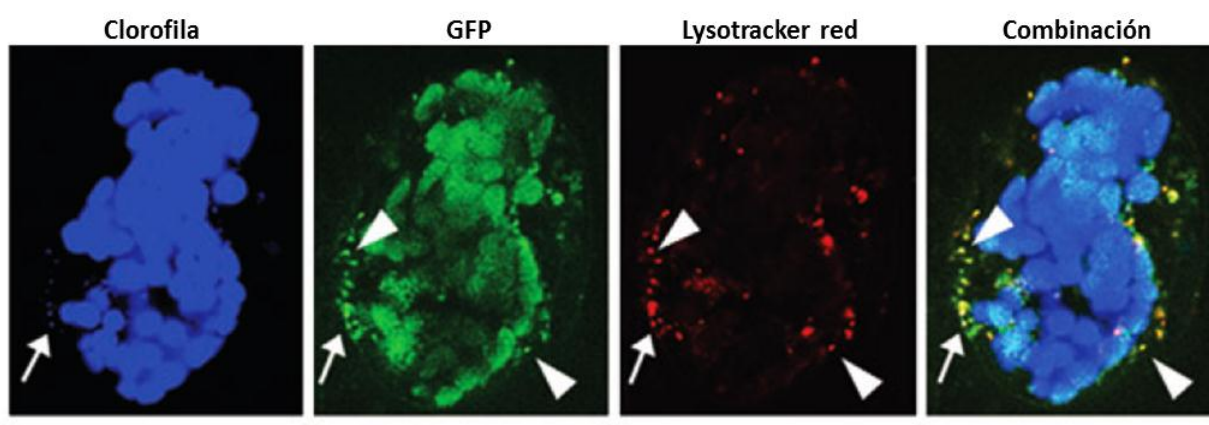


Figura 8: Célula de tabaco senescente con expresión de GFP dirigida al cloroplasto. Detección de clorofila, GFP y *Lysotracker Red* en las VAS (flechas). Tomado de Martínez & Costa *et al.*, 2008.

En plantas de tabaco que expresan la proteína fluorescente GFP (del inglés, green fluorescent protein) unida a una señal de direccionamiento a cloroplasto (TP-GFP, Kohler *et al.*, 1997), se observan cloroplastos fluorescente en hojas maduras, pero en hojas senescentes también se detecta la señal de GFP en las VAS (Fig. 8, Martínez & Costa *et al.*, 2008). Este resultado junto con la detección de clorofila, indicarían que las VAS poseen componentes cloroplásticos. Se ha inmunolocalizado H^+ -Pirofosfatasa (H^+ -PPasa) en VAS de 0.8 μm de diámetro y en la vacuola central de células de hojas senescentes, sin embargo, la proteína de tonoplasto y -TIP no fue detectada en las VAS.

El desarrollo de un método para obtener fracciones enriquecidas en VAS mediante la centrifugación en un gradiente de sacarosa, permitió realizar una caracterización bioquímica parcial de las VAS. De esta manera, se detectó mediante la técnica de *western-blot* que las VAS contienen proteínas cloroplásticas (LSU de Rubisco, Glutamina Sintetasa 2 y la proteína PsaA del fotosistema I), y H⁺-PPasa vacuolar pero carecen de citocromo c (mitocondria), catalasa (peroxisoma), BIP (retículo endoplásmico), Glutamina Sintetasa I (citósol), γ -TIP (vacuola central), LHCII (del inglés, *Light harvesting complex II*), y D1 (proteína del fotosistema II de los cloroplastos) (Martínez & Costa, *et al.*, 2008). La medición de la actividad de la alfa-manosidasa (marcador de Golgi) en la fracción enriquecida en VAS, mostró que está empobrecida en relación a los valores medidos del extracto crudo. Estos datos demuestran que la fracción está enriquecida en VAS al estar bioquímicamente desprovista de otros orgánulos (vacuola central, cloroplastos, mitocondrias, retículo, aparato de golgi, peroxisomas y citósol).

La actividad lítica de las VAS fue confirmada por ensayos *in vitro* donde se incubó, en condiciones fisiológicas, la fracción enriquecida en VAS durante varias horas. Se detectó mediante *western-blot* que la banda de la LSU-Rubisco, presente en las VAS, fue degradada parcialmente a las 4 horas de incubación y que el tratamiento con un cóctel de inhibidores de proteasa inhibía esta proteólisis. Las VAS también participan en la degradación de PsaA mediante la acción de proteasas cisteínicas (Gómez *et al.*, en preparación).

Mediante microscopia confocal espectral, se detectó *in vivo* la presencia de clorofila en las VAS (Martínez & Costa *et al.*, 2008). El análisis mediante HPLC (del inglés, *High Pressure Liquid Chromatography*) de la fracción enriquecida en VAS, mostró que éstas poseen una importante proporción de fluorescencia entre los 670 – 730 nm, correspondiente a la clorofila *a*, en las hojas senescentes inducidas en la oscuridad sin tratamiento con etefón (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Además se detectó la presencia de clorofila *b*, aunque en concentraciones cinco veces menor. Luego de la incubación de una fracción enriquecida de VAS en oscuridad,

se detectaron cantidades crecientes de clorofilo a y feoforbido a, lo cual sugiere que en las VAS también se degradan clorofilas (Gómez *et al.*, en preparación).

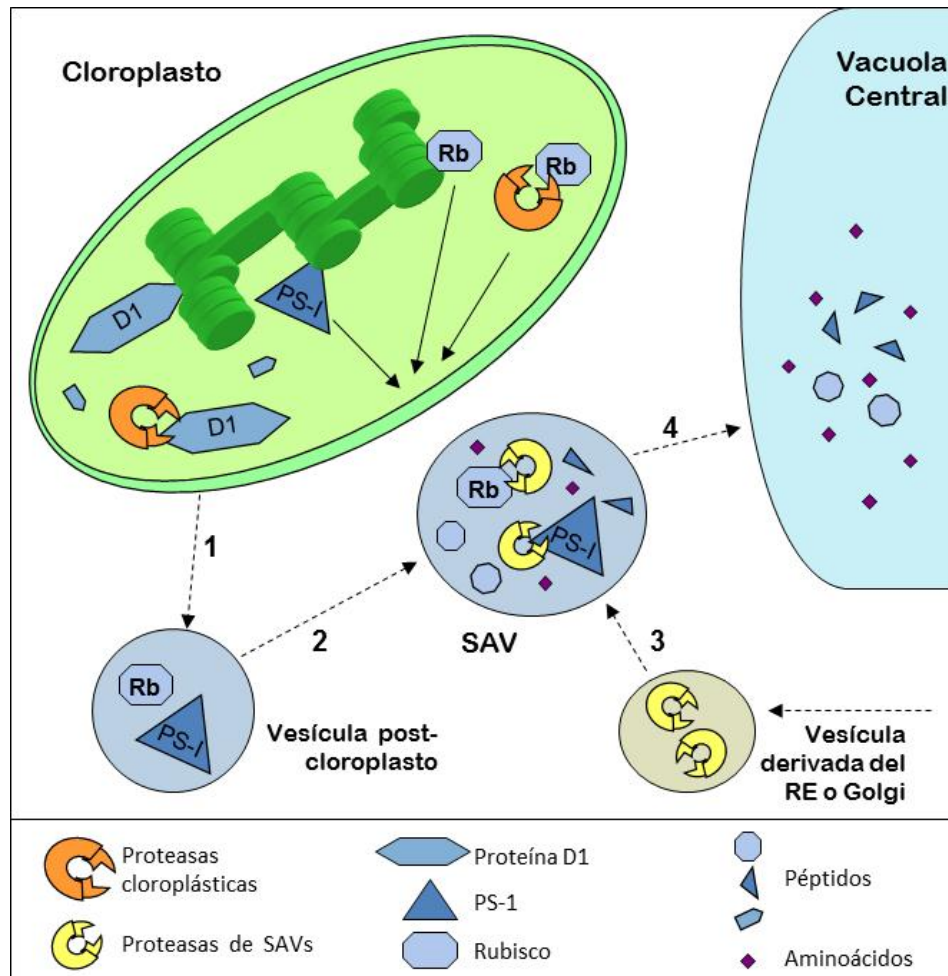


Figura 9: Sistema de hipótesis que describe el mecanismo de acción de las Vacuolas Asociadas a la Senescencia. (Traducido de Costa *et al.*, 2012)

Por lo tanto, las VAS constituyen vesículas que degradan, al menos parcialmente, componentes de los cloroplastos durante la senescencia foliar. No se ha probado concluyentemente, si emplean o no un sistema autofágico para realizar esta tarea. En el mutante de *atg7-1* en *Arabidopsis*, las VAS presentan un patrón similar al genotipo silvestre (Otegui *et al.*, 2005) indicando que ATG7 no es esencial para su formación. Sin embargo, en el

complejo sistema de autofagia en plantas, que actualmente está siendo dilucidado, no todos los componentes esenciales del mecanismo han sido descubiertos.

2 - Delimitación del objeto de estudio.

En esta tesis se pretende abordar a la senescencia en plantas desde una escala celular y molecular, tendiente a profundizar y entender el mecanismo de degradación de cloroplastos. Como se comentó anteriormente, la degradación de los cloroplastos resulta clave en la senescencia de plantas y es de crucial importancia para la producción de alimentos. La comprensión de los mecanismos de degradación de proteínas y removilización de nutrientes, ya sea para sostener la nutrición de las semillas inmaduras o para responder a un estrés, permitirá el desarrollo de nuevas tecnologías que apunten al mejoramiento del rendimiento de los cultivos o la eficiencia en el uso de nutrientes (*v.g.*, N).

La mayor parte de los experimentos en esta tesis se realizaron en *Nicotiana tabacum* (var. Petit Havana). Esta especie posee un desarrollo monocárpico que facilita el estudio de la senescencia a la vez que provee de suficiente material vegetal para la obtención de VAS y el análisis de los parámetros de senescencia. También se empleó *Arabidopsis thaliana* (var. Columbia) por ser la especie vegetal más conocida a nivel molecular y que como consecuencia, posee una importante variedad de herramientas moleculares disponibles. Al igual que el tabaco, *Arabidopsis* es una especie monocárpica, con un patrón de senescencia claro y reproducible (Lim *et al.*, 2007).

Para el presente trabajo se emplearon distintos sistemas experimentales de estudios que fueron escogidos de acuerdo al objetivo específico. Para la mayoría de las metodologías empleadas fue necesario sincronizar, en lo posible, el inicio de los procesos degradativos celulares mediante el uso de cebadores de senescencia. Se empleó la inducción por oscuridad de hojas separadas de la planta y tratadas o no con etefón, un precursor de etileno. La sincronización de la senescencia es esencial para los estudios bioquímicos y morfológicos realizados a nivel celular y molecular. Se conoce que la senescencia inducida en hojas unidas a

la planta o separadas de ella, poseen diferencias importantes a nivel metabólico (Weaver *et al.*, 2001; Soudry *et al.*, 2005). Sin embargo, tanto en hojas con senescencia natural (unidas a la planta) como la inducida por corte y oscuridad, se observaron VAS.

Las vacuolas asociadas a la senescencia forman parte de un posible mecanismo de degradación de los principales componentes de los cloroplastos. Sin embargo, es necesario profundizar en la identidad, funcionamiento y biogénesis de las VAS. ¿Qué mecanismos celulares participan en la formación de las VAS? ¿Cuáles características bioquímicas definen a las VAS? ¿Qué relación existe entre las VAS y otros mecanismos catabólicos conocidos? ¿De qué orgánulos celulares derivan las VAS? ¿De qué manera degradan proteínas cloroplásticas? ¿Cuál es el destino de estos productos en la célula? Estas son algunas de las preguntas que guiaron el desarrollo de este trabajo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es profundizar el conocimiento sobre el desmantelamiento del aparato fotosintético mediado por las Vacuolas Asociadas a la Senescencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Dilucidar el mecanismo de origen de las VAS y su regulación durante la senescencia foliar.
2. Examinar la participación de las VAS en la degradación de proteínas fotosintéticas.
3. Establecer las interacciones entre la vía de degradación mediada por las VAS y la vía de Autofagia en plantas.

HIPÓTESIS GENERAL

“La degradación de componentes fotosintéticos durante la senescencia ocurre fuera del cloroplasto, en vacuolas asociadas a la senescencia (VAS)”.

Hipótesis Específicas:

- “Las VAS forman parte de un mecanismo de degradación de cloroplastos altamente regulado”.
- “Las VAS derivan de los cloroplastos y del aparato de Golgi”.
- “Las VAS degradan Rubisco mediante proteasas cisteínicas dependientes de acidez”.
- “La autofagia participa en el desarrollo de las VAS”.

Materiales y Métodos

2.1- Material biológico y obtención de muestras.

2.1.1- Material vegetal y condiciones de cultivo.

En esta tesis se emplearon dos especies comúnmente usadas en investigaciones sobre fisiología vegetal y biología molecular de plantas: Tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana) y Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* Heynh eco. Columbia).

Las plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 10 h, $200 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de luz, a 22°C constante. Las semillas de Arabidopsis fueron sometidas a un tratamiento de frío (4°C) durante 72 h en macetas individuales de 200 ml previo a depositarlas en la cámara de cultivo.



Fig. 1: Invernadero climatizado con plantas de tabaco. Instituto de Biología de la Universidad Martín Lutero, Halle, Alemania.

Las plantas de tabaco fueron cultivadas bajo invernadero en macetas de 1.5 L, en las instalaciones del Instituto de Fisiología Vegetal (UNLP-CONICET) de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires (34°55' Sur, 57°54' Oeste). Las plantas de tabaco empleadas para la cuantificación de la expresión de genes mediante RTq-PCR y las observaciones a lo largo del tiempo de la presencia de VAS (secciones 3.2, 3.4, 3.5), fueron cultivadas durante el mes de octubre en el invernadero climatizado del Instituto de Biología de la Universidad Martín Lutero en la ciudad de Halle, Alemania (51° 28' Norte, 11° 54' Este, Fig. 1).

En algunos experimentos se empleó la línea TP-GFP de tabaco (var. Petit Havana) que expresa GFP fusionado a la señal de tránsito al cloroplasto del gen *recA* bajo el promotor CaMV 35S (Köhler *et al.*, 1997). Este mutante fue empleado en las observaciones realizadas mediante microscopía confocal y para algunos estudios bioquímicos. También se trabajó con plantas de tabaco que expresan SAG12 fusionado a GFP bajo el promotor natural de SAG12 (Carrión *et al.*, en preparación).

En los ensayos referentes a la autofagia se usó el mutante *atg5-1* generado por la inserción (aleatoria) de T-ADN en *atg5* de *Arabidopsis Col-0*, obtenido de la colección SAIL (Sessions *et al.*, 2002) y caracterizado por Thompson & Vierstra (2005).

Se emplearon plantas de *Arabidopsis* (var. Columbia) transformadas con ATG8a:GFP bajo el control del promotor 35S (en NASC, N39996; Thompson *et al.*, 2005). ATG8 es el marcador más empleado para detectar estructuras autofágicas en levaduras y plantas (Mitou *et al.*, 2009). También se usaron plantas de *arabidopsis* transformadas con el dominio transmembrana de la α -1,2-manosidasa (GmMan1) fusionado con la proteína amarilla fluorescente, YFP (Nelson *et al.*, 2007).

2.1.2- Inducción de la senescencia.

Además de estudiar la senescencia natural de hojas unidas a la planta, para acelerar la senescencia, se emplearon hojas separadas de la planta e incubadas en oscuridad; y hojas separadas de la planta, incubadas en oscuridad y tratadas con Etefón (un compuesto que libera etileno). El tratamiento con Etefón consistió en sumergir las hojas recién

cortadas de la planta en una solución de 100 ppm y 0.1% (v/v) de DMSO (Dimetilsulfóxido) durante 3 *min* en agitación. Luego, el excedente de Etefón se retiró con papel secante y las hojas fueron colocadas en recipientes herméticos con papel de filtro humedecido durante 48 a 72 h en oscuridad.

También se empleó la inducción de la senescencia por oscuridad en hojas unidas a la planta. Se procedió a tapar hasta dos hojas por planta de *Arabidopsis* con papel metálico, mientras el resto de la planta continuaba siendo iluminada. Luego de 48 o 72 h, las hojas fueron destapadas y sometidas al protocolo descripto en cada experimento.

2.1.3- Homogenatos de Hojas.

El extracto crudo de hojas, tanto de tabaco como de *Arabidopsis*, fue empleado para el análisis de la variación en el contenido total de proteínas (método de Bradford y SDS-PAGE) y para la técnica de inmunodetección de proteínas (método de *Western-blot*). El protocolo de homogenización de hojas fue modificado en función de los requerimientos de estas técnicas.

- Extracción de proteínas para electroforesis en gel de SDS-PAGE: las hojas fueron homogenizadas en mortero con Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo del tejido. Luego se agregó la solución de extracción constituida por 25 mM de buffer Fosfato pH 7.5, 10 mM de Cisteína, 1 % de Polivinilpirrolidona insoluble, 2 % de SDS, 1 mM de PMSF y 2 mM de EDTA. Finalmente, el extracto crudo fue centrifugado a 9000 g para obtener el sobrenadante al cual se le agregó el buffer de muestra (como en Laemmli, 1970).
- Extracción de proteínas para su cuantificación: La homogenización de los tejidos se realizó en mortero y Nitrógeno líquido. El polvo resultante fue disuelto en buffer Fosfato 20 mM pH 7, 2 mM de EDTA, 1 mM de PMSF y 10 mM de Cisteína. Los extractos fueron sonicados durante 5 min y centrifugados a 9000 g durante 15 min.

2.1.4- Aislamiento de VAS.

Para el aislamiento de las VAS se emplearon hojas de tabaco cortadas de la planta, tratadas con etefón e incubadas durante 48 h en oscuridad. Las hojas se homogeneizaron en solución de Homogenización (25 mM de buffer MES pH 7.4, 0.6 M de Manitol, 10 mM de Cisteína, 2 mM de EDTA, 1% de Polivinilpirrolidona (PVPP insoluble) y 6 mM de Cloruro de Calcio) y el homogenato se incubó con 0.1 mg/ml de Rojo Neutro durante 15 min en agitación. Luego de la filtración a través de una malla de nylon, se centrifugó el extracto a 2500 g durante 5 min para

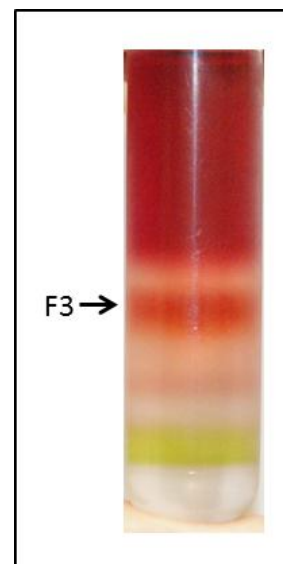


Fig. 2: Resultado del fraccionamiento en gradiente de sacarosa. La fracción F3 corresponde a la fracción enriquecida en VAS

separar los restos tisulares, núcleos, cloroplastos, etc. del resto del contenido celular. El sobrenadante así obtenido, fue sembrado sobre un gradiente discontinuo con 5, 25, 35, 45 y 60% de sacarosa en buffer MES 25 mM, pH 7.4 y 0.6 M de Manitol. El gradiente fue centrifugado a 100.000 g en una ultracentrífuga con roto de ángulo libre (OptimaMax®, Beckman-Coulter) durante 60 min a 4°C. Se obtuvo una separación de los componentes celulares en 10 bandas o fracciones

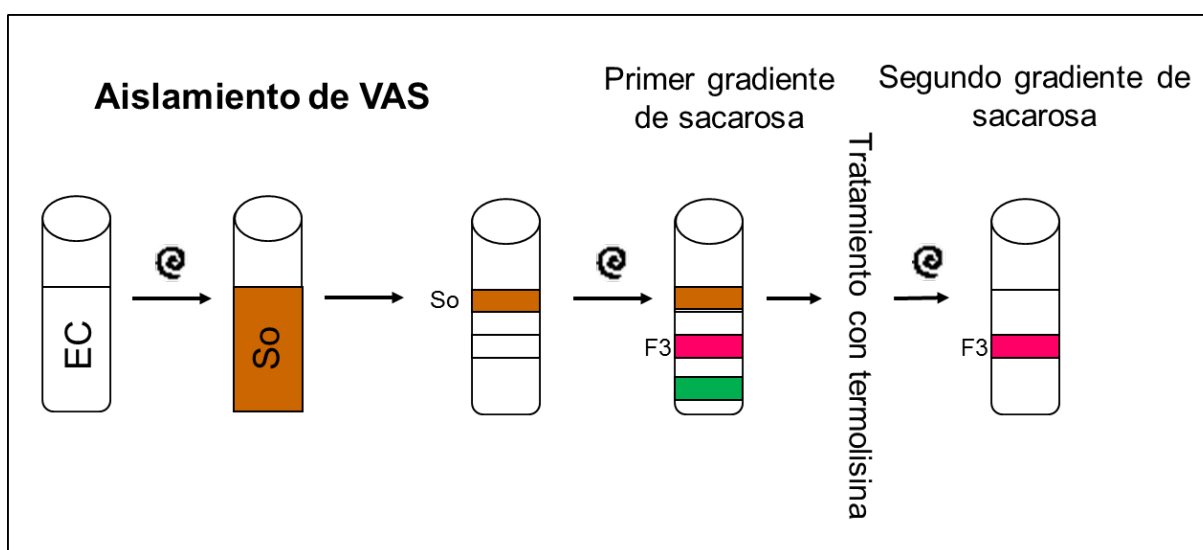


Fig. 3: Esquema simplificado del protocolo de obtención de la fracción enriquecida en VAS (F3). Extracto Crudo (EC), Sobrenadante (So), espirales (centrifugación)

visiblemente discretas que se diferencian por su coloración o ausencia de ella (Figs. 2 y 3). La tercer banda, desde arriba hacia abajo, corresponde a la fracción enriquecida en VAS (Martínez & Costa *et al.*, 2008).

2.1.5- Tratamiento con Termolisina

Para mejorar la calidad del enriquecimiento, la fracción 3 o “F3” fue re-aislada repitiendo la separación en el gradiente discontinuo de sacarosa, como se indicó antes. En algunos casos, se intercaló un tratamiento con Termolisina entre los dos aislamientos para evitar que en la F3 queden proteínas fuera de las VAS que pudieran interferir con los ensayos siguientes. La Termolisina es una metaloproteasa inespecífica que al no atravesar las membranas biológicas, hidroliza las proteínas que se encuentran por fuera de vesículas y orgánulos (Cline *et al.*, 1984). Entonces, luego de la obtención de la primera F3, se la sometió a un tratamiento con 60 µg/ml de termolisina (Sigma®) y 0.5 mM de cloruro de calcio durante 30 min a 4°C. La actividad de la termolisina se detuvo con 0.15 mg/ml de EGTA. Finalmente, se volvió a aislar la F3 enriquecida en VAS en un nuevo gradiente de sacarosa.

2.1.6- Concentración de la F3

Dado que las altas concentraciones de sacarosa de la F3, interfirieron en algunos de los experimentos, se adoptaron dos estrategias para removerla y concentrar la fracción:

1- Precipitación de las VAS mediante centrifugación a 3000 g de la F3 diluida en una proporción de 1:2 v/v con una Solución Isotónica de MES 25 mM pH 7.4 y 0.6 M de Manitol. El precipitado resultante fue resuspendido en Solución de Extracción, si se



Fig. 4: Dispositivos de microfiltración. Nanosep (Pall Corporation®). Los valores consignados sobre los tubos corresponden a los tamaños de exclusión.

requería para geles de SDS-PAGE, o en Solución Isotónica si era necesario conservar la estructura vesicular de las VAS.

2- Se empleó la microfiltración para eliminar totalmente la sacarosa de la muestra. La F3 fue microfiltrada en los dispositivos “Nanosep” (Pall Corporation®) con un tamaño de malla de 10 KDa con una centrifugación de 13.000 g durante 40 min (Fig. 4). Las proteínas fueron lavadas con buffer Fosfato 25 mM a pH 7 y 0.1 % de Tritón X100 y se extrajeron en el buffer de muestra.

2.1.7- Aislamiento de Cloroplastos.

En un mortero refrigerado con solución isotónica (50 mM de HEPES pH 7.6, 330 mM de Sorbitol, 2 mM de EDTA, 1 mM de $MgCl_2$, 5 mM de ácido ascórbico, 0.05% p/v de Albúmina Bovina) se homogenizaron hojas de tabaco con arena de cuarzo. Este extracto fue colocado sobre una Solución de Percoll (50 mM de HEPES pH 7.6, 330 mM de Sorbitol y 35% v/v de Percoll) en un tubo tipo Falcon y se centrifugó a 3000 g durante 5 min. El precipitado resultante, conteniendo los cloroplastos intactos, fue resuspendido con Solución de Lavado (50 mM de HEPES pH 7.6, 330 mM de Sorbitol) adicionada con 60 $\mu g/ml$ de termolisina y 0.5 mM de cloruro de calcio e incubado durante 30 min a 4°C. Luego, la reacción de proteólisis se detuvo con 0.15 mg/ml de EGTA y se re-aislaron los cloroplastos en Percoll de la misma manera. Se lavó dos veces el precipitado con Solución de Lavado y finalmente se resuspendió el precipitado en Solución de Lisis (50 mM de HEPES pH 7.6) para liberar las proteínas cloroplásticas solubles.

2.1.8- Aislamiento de Células.

Fragmentos de hojas de tabaco de aproximadamente 2 mm² fueron colocados en Solución de Maceración (20 mM de MES pH 5.5, 0.5 M de Manitol, 0.25 % p/v de Macerozima R10®), sometidos a un vacío parcial durante 5 min para favorecer la infiltración de la solución y luego incubados a 37°C por 2 h en agitación fuerte. El macerado fue filtrado en una malla de nylon y centrifugado a 3 g por 3 min. El precipitado formado

por células y restos de tejidos fue lavado dos veces con la misma solución anterior pero sin enzimas.

2.1.9- Obtención de Exudados del Floema.

Se cortaron hojas de Arabidopsis por el peciolo a 3 mm de la lámina y se sumergieron inmediatamente por el extremo cortado en una solución de 20 mM EDTA pH 8 durante 15 min a temperatura ambiente (adaptado de Urquhart & Joy, 1981). De esta manera se lavaron los fluidos celulares productos del corte que podrían interferir en los análisis posteriores. Luego se lavaron los peciolo con agua destilada y se los sumergió en una nueva solución con 20 mM de EDTA

tratando que ninguna parte de la hoja toque el líquido a excepción del extremo del peciolo (Fig. 5). Al cabo de 20 min, la solución de extracción fue almacenada a -80°C para su posterior análisis.



Fig. 5: Esquema del mecanismo de obtención del exudado floemático en hojas cortadas de Arabidopsis.

2.2- Análisis de Proteínas

2.2.1- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La técnica de electroforesis permite la separación de proteínas según su relación carga/masa cuando se mueven a través de un gel poroso por la aplicación de un campo eléctrico. Se emplearon geles de poliacrilamida, una matriz polimerizada de acrilamida y N,N'-metilen-(bis-acrilamida), en una relación final de 30% p/v de acrilamida y 1% p/v de bis-acrilamida. Se utilizó el método desarrollado por Laemmli (1970) que consiste en dos geles consecutivos con distinta porosidad y pH: el superior es un gel concentrador de

proteínas con poliacrilamida al 4% p/v y pH 6.8, seguido por un gel separador de proteínas con una concentración de 12% de acrilamida y pH 8.8.

Se empleó la técnica de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y para eso se agregó dodecil-sulfato de sodio (SDS) 1% p/v a los geles y buffers de los reservorios electródicos. El SDS es un detergente aniónico que se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas y separa la mayoría de ellas en sus subunidades componentes. Al estar todas las proteínas asociadas con el SDS que posee carga negativa, las proteínas migran a través del campo eléctrico mientras se separan por su masa molecular.

Para elaborar los geles de poliacrilamida se utilizó el dispositivo Mini Protean III (BIORAD®). Las muestras fueron preparadas con el agregado del mismo volumen del buffer de muestra tipo Laemmli 2X conteniendo 4% p/v de SDS, 0.01% p/v de azul de bromofenol, 125 mM de TRIS a pH 6.8 y 10% v/v de glicerol. Luego de agitar fuertemente, las muestras fueron sonicadas durante 5 min. La mezcla se centrifugó a 13.000 g durante 5 min para luego sembrar el sobrenadante en las “fosetas” (calles). La electroforesis fue realizada a 14 mA de corriente constante y voltaje variable hasta la finalización de la corrida. En aquellos casos en que fue necesario mejorar la separación de las proteínas, se emplearon geles de resolución con un gradiente lineal de concentración de acrilamida (10-15 %).

2.2.2- Tinción de proteínas en gel.

Azul de Coomassie: Luego de finalizadas las corridas electroforéticas, los geles fueron transferidos a recipientes con solución de tinción. La solución de tinción estándar empleada fue: 1% p/v *Coomassie Brilliant Blue* R250 (Sigma®), 50 % v/v de Metanol, 10 % v/v de ácido Acético glacial y agua bidestilada. Los geles se mantuvieron en la solución de coloración durante 12 h en agitación a temperatura ambiente. La decoloración de los geles se realizó con 20% v/v Metanol y 7% v/v ácido Acético glacial.

2.2.3- Western-blot

La técnica de *Western-blot* consiste en la inmuno-detección de proteínas específicas que fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa a partir de una

electroforesis en gel. La ventaja de esta metodología radica en su alta especificidad y sensibilidad. La sensibilidad es producto de una reacción quimio-luminiscente que amplifica la señal original impresionando una película fotográfica que luego es revelada.

Una vez finalizada la electroforesis de proteínas, el gel fue incubado junto con una membrana de nitrocelulosa en Solución de Electro-transferencia para luego armar el dispositivo correspondiente de la Mini Protean III (BIORAD®). Se realizó la transferencia a 200 mAmp durante 90 min en una solución de electro-transferencia (48 mM de TRIS-base, 39 mM de Glicina, 0.04% de SDS y 20% de Metanol).

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, las proteínas fueron teñidas con Rojo Ponceau (0.1 % Rojo Ponceau y 5 % de ácido acético) durante 10 min en agitación. Las proteínas teñidas se vuelven evidentes luego del lavado de la membrana con agua bidestilada. El bloqueo de la membrana se realizó con 5 % (p/v) de leche descremada durante 10 h en agitación.

El protocolo de incubación de los anticuerpos primarios y secundarios variaron de acuerdo a las necesidades de cada experimento, siendo en general: 4 h para el anticuerpo primario y 1 hora para el anticuerpo secundario.

2.2.4- Cuantificación de Proteínas.

Método de Bradford (1976): Está basado en el cambio de coloración del colorante *Coomassie brilliant blue* G-250 de manera proporcional a la concentración de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (principalmente arginina) y aromáticos de las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm.

Las muestras obtenidas a partir de sobrenadantes de extractos crudos de hoja o de la F3 tratados con inhibidores de proteasas, se mezclaron con el reactivo de Bradford (*Coomassie Brilliant Blue* G-250 0.01% p/v, 4.7% v/v de Etanol y 8.5% v/v ácido Ortofosfórico) en una proporción 95:5 de reactivo:muestra. Se desarrolló la reacción

durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó el contenido de proteína por espectrofotometría a $\lambda = 595$ nm. Como patrón de concentración se empleó BSA.

Cuantificación por densitometría: Este método consiste en la estimación de proteínas mediante la cuantificación relativa de la densidad de las proteínas teñidas en un gel de electroforesis. Se colocaron distintas cantidades de BSA como referencia en algunas calles del mismo gel donde se separaron las muestras a cuantificar. Luego de teñir los geles con *Coomassie* R250, como se indicó anteriormente, se los escaneó y con el programa informático SigmaGel® se cuantificó el contenido de cada muestra en relación al patrón. Generalmente para la cuantificación de proteínas se empleó el método de Bradford y el densitométrico como control.

2.2.5- Cuantificación de Aminoácidos

Para la medición del contenido de aminoácidos se utilizó una adaptación de la técnica de Moore (1968) que consiste en una extracción alcohólica de aminoácidos del extracto de hoja y la posterior reacción de la Ninhidrina con los alfa-aminoácidos, dando una coloración que pasa del azul al violeta intenso.

Las hojas de *Arabidopsis* fueron homogenizadas en mortero con nitrógeno líquido. Los aminoácidos se obtuvieron por sucesivas extracciones con alcohol etílico 80% v/v, 60% v/v y finalmente en agua bidestilada. La mezcla de reacción colorimétrica consistió en volúmenes iguales de muestra, solución de ninhidrina (3% de ninhidrina en Dimetilsulfóxido) y solución de reacción (buffer Acetato a pH 5.3 y 0.01 M de Cianuro de Potasio). Inmediatamente después se calentaron los tubos a 90°C durante 15 min y la reacción fue detenida con alcohol isopropílico. Se midió la absorbancia de las muestras y el patrón de ácido glutámico mediante espectrofotometría a 570 nm.

2.3- Detección y Purificación de Proteasas.

2.3.1- Detección de Proteasas Cisteínicas.

La detección de proteasas cisteínicas se realizó con un análogo biotinilado de E-64 denominado DCG-04 (Greenbaum *et al.*, 2000). E-64 es un inhibidor diagnóstico de proteasas cisteínicas. El DCG-04 se une en forma covalente y de manera específica al sitio activo de las proteasas cisteínicas y puede ser detectado con estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa (Fig. 6).

Las hojas de tabaco fueron homogeneizadas en agua destilada a 4° C y centrifugadas a 13000 g durante 15 min. Un volumen del sobrenadante fue mezclado con 3 volúmenes de 5 µM de DCG-04 en 25 mM de buffer Na-acetato, 10 mM de cisteína a pH 5.5 y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente con agitación suave durante 3 h. Luego las proteínas fueron precipitadas con acetona a -20°C, resuspendidas en buffer de muestra (Laemmli) y hervidas durante 1 min antes de sembrar la muestra en un gel de SDS-PAGE. Para controlar la especificidad de la marcación con DCG-04, un control de competencia fue llevado a cabo sobre alícuotas paralelas del extracto de proteínas con E-64. Estas muestras fueron pre-incubadas con 100 µM de E-64 en buffer (25 mM de Na-acetato, 10 mM de cisteína, a pH 5.5) por 1 h y luego tratada con DCG-04 como se describió antes. Las muestras fueron corridas en SDS-PAGE 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. A la incubación con Estreptavidina-peroxidasa 1:1000 (v/v) (Sigma®) durante 5 h le siguió el revelado con reactivos quimioluminiscente.

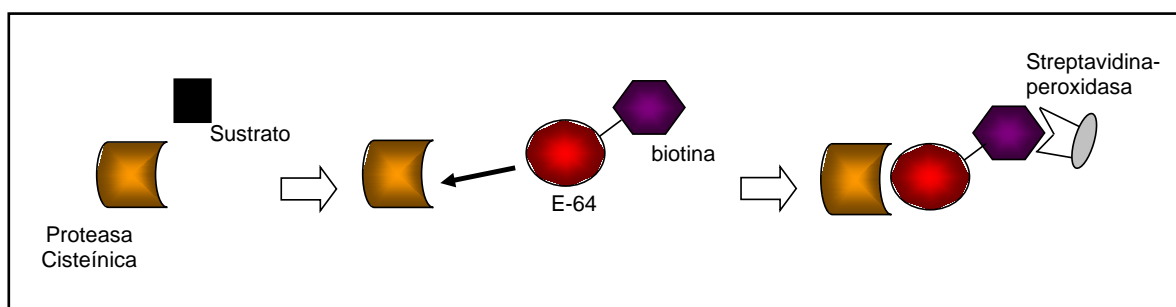


Fig. 6: Esquema simplificado de la detección de proteasas cisteínicas a través de su actividad. El marcador DCG-04 (E-64 + Biotina) se une covalentemente al sitio activo de las proteasas cisteínicas. Luego, la estreptavidina-peroxidasa se une fuertemente a la fracción de biotina del DCG-04.

2.3.2- Purificación de Proteasas Cisteínicas.

Luego del tratamiento de marcación con DCG-04, el precipitado acetónico fue resuspendido en buffer fosfato salino (PBS) y 0.05% de Tritón X-100. Se emplearon “*beads*” magnéticas (MagSelect®, Sigma®) recubiertas con estreptavidina para capturar las proteasas cisteínicas marcadas con biotina presentes en la muestra. Luego de lavar dos veces las *beads* con PBS, se agregaron 50 µl a la muestra y se las incubó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Para lavar las *beads* de cualquier proteína que no estuviera adherida específicamente, se realizaron tres rondas de lavados en PBS con ayuda de centrifugación y el uso de un imán para evitar la pérdida de las *beads* magnéticas. El último paso de lavado se realizó con PBS y 0.1% de Tritón X-100. La elusión de las proteasas se realizó con el agregado a las *beads* de buffer muestra de Laemmli 2X y la incubación a 90°C durante 1 min. La elusión se recuperó del sobrenadante mediante una centrifugación de 9000 g por 30 seg.

La purificación de las proteasas cisteínicas también se realizó sobre la fracción enriquecida con VAS (F3). En este caso, fue necesario eliminar el alto contenido en azúcares de la F3 y para eso se procedió con la microfiltración en Nanosep de 30 kDa. Finalmente, la muestra lavada fue solubilizada en buffer Na-acetato a pH 5.5, con 10 mM de cisteína, 5 µM de DCG-04 y se procedió a la purificación como se indica anteriormente.

2.4.1- Medición del contenido de clorofila mediante SPAD y Espectrofotometría.

Para la medición relativa y no destructiva del contenido en clorofilas, se empleó el colorímetro SPAD 502 (Konica-Minolta®). Este dispositivo expresa “valores de SPAD” que pueden ser relacionados con el contenido de clorofilas medido por espectrometría (Ling *et al.*, 2011).

Mediante el método de Inskeep & Bloom (1985) se cuantificó el contenido de clorofilas totales en discos de hojas. La técnica consiste en colocar un disco de hoja en un 1 ml de N,N-Dimetilformamida durante 20 h a temperatura ambiente. Una vez que el solvente extrajo los pigmentos, se midió la absorbancia a 647 y 664.5 nm en un espectrofotómetro. El contenido de clorofilas fue estimado con la ecuación: $15.9 \times \text{Abs}_{647} + 8.08 \times \text{Abs}_{664.5}$. Luego ese valor fue expresado en función de la superficie del disco de hoja.

2.4.2- Medición del rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II.

Se empleó un fluorímetro bidimensional (*Imaging-PAM Chlorophyll Fluorometer*, Heinz Walz®) para la estimación potencial del rendimiento cuántico del fotosistema II. Este dispositivo tiene la capacidad de aplicar pulsos de amplitud modulada de luz sobre una hoja para cuantificar la fluorescencia de la clorofila y estimar algunos parámetros de la capacidad fotosintética (Lichtenthaler & Miehe, 1997).

- Microscopía

2.5.1- Microscopía de Fluorescencia y Confocal

La microscopía de fluorescencia permite visualizar moléculas fluorescentes, denominadas fluoróforos, propias del tejido como la clorofila y exógenas como la Rodamina, Fluoresceína, etc. Existen fluoróforos comerciales que tienen afinidad a determinadas moléculas o condiciones que son empleados como marcadores celulares. El *Lysotracker Red* (Invitrogen®) o el Rojo Neutro se concentran en compartimientos ácidos de la célula y permiten detectarlos fácilmente a través de un microscopio de fluorescencia.

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Olympus® BX-51) con dos cubos de fluorescencia: con máximos de excitación/emisión de 545/580 y 470/525 nm. Este microscopio dispone de una cámara digital Olympus® A330 adaptada para la captura de imágenes.

Para los ensayos que requirieron una mejor resolución y la colocalización de dos o más fluoróforos, se empleó un microscopio laser confocal (Leica®, SP5). Esta tecnología permite detectar la fluorescencia originada en un plano fino (alrededor de 0,5 - 1 μm de espesor) de la muestra sin el ruido proveniente de otros planos por encima y por debajo del mismo. Así la imagen se vuelve más clara y la muestra no requiere de una preparación compleja. Esta técnica permite realizar observaciones de muestras *in vivo* con relativa facilidad. El microscopio confocal modelo SP5 dispone de un laser de Argón y otro de Helio-Neón. El límite de resolución de este microscopio depende del laser empleado para excitar al fluoróforo, pero en promedio es de 230 nm.

Para tratar de evitar imágenes difusas debido a la refracción de la luz en la interfase agua-aire de la muestra, se empleó Perfluorodecalina (fluorocarbono, $\text{C}_{10}\text{F}_{18}$ de Sigma®) como medio de montaje de las secciones de hojas, dado que la Perfluorodecalina desplaza el aire presente en el tejido sin afectar su estructura (Littlejohn *et al.*, 2010).

En general se utilizaron las siguientes condiciones de excitación/emisión: fluorescencia de la clorofila 633/670-730 nm, GFP 488/505-530 nm, *Lysotracker Red* o Rojo Neutro 543/585-615 nm.

Todas las observaciones mediante microscopía confocal y de epifluorescencia fueron realizadas con un objetivo plano acromático 63X, 1.4 NA.

2.5.2- Detección de VAS por su acidez.

Se empleó *Lysotracker Red* (Invitrogen®) para localizar las VAS en tabaco y Arabidopsis. Pequeños trozos de hoja o células aisladas se incubaron durante 20 o 10 min, respectivamente, en *Lysotracker Red* 1 μM en buffer MES a pH 6.4. Luego de lavar las muestras con buffer durante 10 min, se procedió a montarlas sobre portaobjetos.

2.5.3- Detección de la actividad de proteasas cisteínicas en las VAS.

Para probar la actividad de proteasas cisteínicas en las VAS *in vivo*, se trataron células y secciones de hojas con un derivado de la rodamina 110, denominado R6502

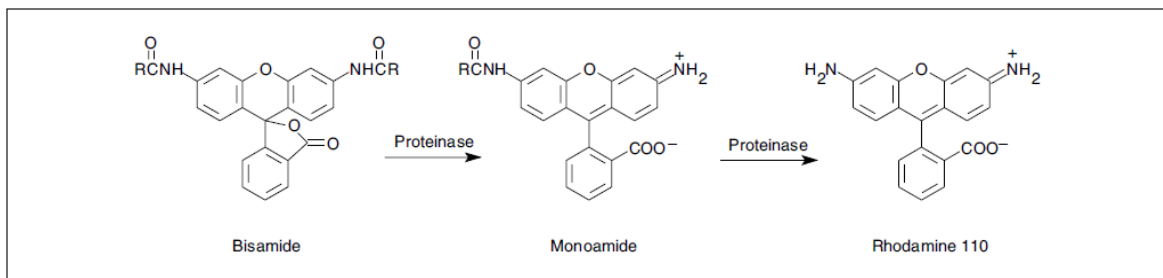


Fig. 7: Fórmula y efecto de las proteasas cisteínicas sobre el fluoróforo Rodamina 110 (R6502). De Molecular Probes®.

(Molecular Probes®). Este fluoróforo es una bis-amida que se vuelve fluorescente cuando es hidrolizada por proteasas, preferentemente por proteasas cisteínicas (Fig. 7, www.probes.com). Las muestras fueron incubadas con 50 μM de R6502 en 25 mM de buffer MES a pH 6.2 durante 20 min y luego lavadas dos veces para poder ser observadas mediante microscopía confocal con excitación a 488 nm y emisión en 505-530 nm.

2.5.4- Inmunofluorescencia.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre tejido y células. Pequeños fragmentos de tabaco fueron fijados en 4% de paraformaldehído y 0.05% de Tritón X-100 durante 12 h. Los fragmentos se lavaron con PBST y se los incubó en PBST y 10% de sacarosa durante 5 h para permeabilizar las membranas sin modificar sus estructuras. Los cortes histológicos fueron realizados con criótomo obteniendo secciones de 30 μm de grosor que se adhirieron sobre los portaobjetos con una capa de poli-lisina. Luego de tres lavados en PBST de 10 min se procedió al bloqueo con 3% de BSA durante una hora. Se aplicó el anticuerpo contra la PsaA en una proporción 1:500 en PBST por 2 h en agitación sobre el portaobjetos con las muestras. Después de dos lavados se incubaron los cortes en Alexafluor 488 (Molecular Probes®) en una proporción 1:200 en PBST y 1% de BSA durante

1 hora en agitación. Luego de dos lavados, los tejidos se montaron en 60% de Glicerina y observados en microscopio de epi-fluorescencia.

En el caso de las células, estas se fijaron en 4% de paraformaldehído (en buffer MES 25 mM y 0.6 M de Manitol) durante 3 h a 4°C. Luego de lavar las células, se colocó el anticuerpo primario en la solución con células por 3 h más en agitación suave y temperatura ambiente. Después de dos lavados, centrifugando los tubos a baja velocidad y eliminando el sobrenadante, las células presentes en el fondo del tubo fueron resuspendidas en la solución con el anticuerpo secundario e incubadas durante 2 h. Previa a la observación, las células fueron nuevamente lavadas y montadas en 60 % de glicerina.

2.5.5- Corrección y Análisis de imágenes.

Las fotografías tomadas con el microscopio de epi-fluorescencia y el microscopio confocal fueron procesadas empleando el programa informático “ImageJ 1.43” (*National Institutes of Health, USA*).

- Actividad de Proteasas.

2.6.1- Autodigestión de las VAS.

Con el fin de evaluar la función lítica de las VAS, se realizó un ensayo de autodigestión. Este consistió en comparar el contenido de proteínas en las VAS antes y después de su incubación en condiciones propicias para la actividad de proteasas.

Las VAS fueron aisladas de hojas de tabaco inducidas a “senescer” con tratamiento de Etefón y 48 h de incubación en oscuridad. Durante el aislamiento de la F3 se incluyeron separadamente en los buffers inhibidores de proteasas (serínicas, 0.1 mM AEBSF), (cisteínicas, 50 μ M E-64), o un cóctel de inhibidores de proteasas 0.01% (v/v, Sigma®). Luego, las F3 tratadas de esta manera fueron colocadas en buffer Acetato con pH 5.5 e incubadas durante 4 h en oscuridad y temperatura ambiente, en presencia de los respectivos inhibidores. La proteólisis se detuvo agregando el cóctel de inhibidores de proteasas a todos los tratamientos. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE 9% de

acrilamida, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con un anticuerpo contra LSU (del ingles, *Large Subunit*) de Rubisco. La variación en el contenido de LSU fue analizado mediante el programa SigmaGel®.

2.6.2- Inhibición *in vivo* de las Proteasas Cisteínicas.

Discos de hoja de tabaco tratados con Etefón, fueron incubados con 100 μ M de E-64 o sólo buffer (control) en *cajas de petri* por 48 h en oscuridad. Paralelamente se mantuvo en cámara húmeda y oscuridad la misma hoja para el control de la actividad normal de proteasas (Fig. 8). Se analizó la degradación de Rubisco mediante la inmunodetección de LSU por *Western blot*.

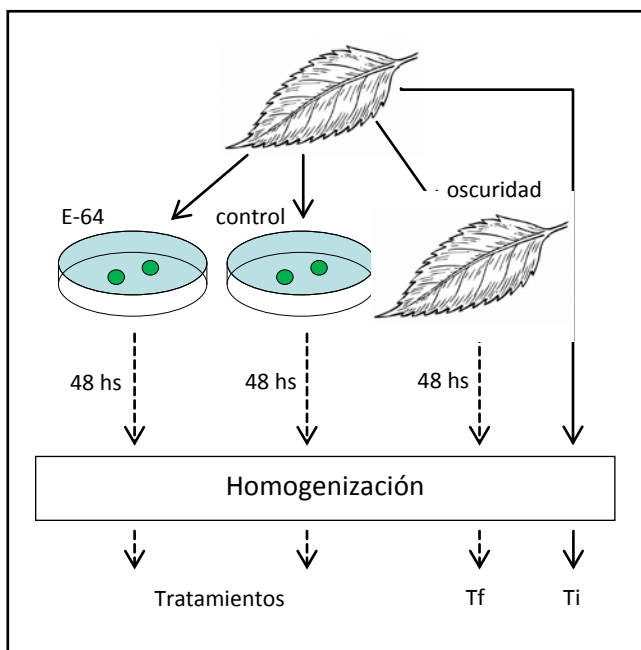


Fig. 8: Esquema simplificado del protocolo empleado para el ensayo de la inhibición *in vivo* de las proteasas cisteínicas

- PCR en tiempo real

La “qRT-PCR (del ingles, *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real cuantitativa” es una poderosa herramienta de la biología molecular que permite cuantificar la cantidad de un determinado RNA mensajero de manera más sensible y precisa que por otras metodologías (Czechowski *et al.*, 2005). Se basa en la medición del incremento del producto de cada ciclo de amplificación a través de un fluoróforo que se une inespecíficamente a la doble cadena de ADN.

2.7.1- Elección de los genes.

Se seleccionaron 5 genes que están asociados a la senescencia foliar, un control negativo de la senescencia y 2 genes de referencia (o de normalización), todos del genoma de *Nicotiana tabacum*. De los genes asociados a la senescencia están: SAG-12 (RNAm HQ108340) como el marcador de senescencia más empleado en biología molecular de plantas; NTCP1 (RNAm AY881011), es una proteasa cisteínica que se expresa durante la senescencia en hojas de tabaco (Beyene *et al.*, 2005); CP23 (RNAm AY017412) o Aleuraína es una proteasa cisteínica implicada en la germinación y en la senescencia; PPasa (RNAm X83730) es una pirofosfatasa presente en el tonoplasto y en las VAS (Otegui *et al.*, 2005) y V-ATPasa (RNAm X95751) una bomba de protones presente en la vacuola central y en las VAS (Gómez *et al.*, en preparación). La proteasa cisteína NTCP2 está presente en hojas maduras y durante la senescencia disminuye su expresión (Beyene *et al.*, 2005), lo cual la califica como control negativo de los genes expresados durante la senescencia. Los genes de referencias EF-1alfa (del ingles, *Elongation Factor*) y PP2 (del ingles, *Protein phosphatase-2*) muestran una expresión constante durante el ciclo de vida de tabaco y son especialmente estables durante la senescencia de tabaco (Schmidt *et al.*, 2010).

2.7.2- Diseño de los Cebadores

Los cebadores se diseñaron mediante el programa informático *Primer Select* (NCBI, USA). Los parámetros elegidos fueron: entre 80 – 150 pares de bases (pb) del amplicón, entre 18 y 25 pb del cebador, entre 57 y 65°C de temperatura de Melting y una proporción de guaninas/citocininas de aproximadamente 55%. (Fig. 9)

Nombre	Secuencia
NtEF1-alpha_F1	CCCAAGAGGCCACAGACAAG
NtEF1-alpha_R1	TCAGACCAGTGGGACCAAAAGTAAC
NtPP2A_F1	CCTGCCTGTCATTGTCAACTTCTCT
NtPP2A_R1	CTCAGGCCCTACAGCTTCACATA
NtSAG12_F1	GCTACGGAAGGGCTACACCAAC

NtSAG12_R1	TCATCCTCTCCTTCGACATCACAGT
NtCP2_F2	GCTGGGCATTTTCAACTGTCGT
NtCP2_R2	CAGTATTGATGCCTCCCTTCTTCTT
NtCP23-like_F1	CTCACTCCTATTGGCTCTCGTCGTC
NtCP23-like_R1	TTCTCCAGCTCATGTAAACCGTCAG
NtCPR1-like_F2	AACCTGTTTGCGTAGCCATTGA
NtCPR1-like_R2	GGTCGACTTCTTCTCCACATTCTCC
X83730_F2	CCATCGGATTCGTGAAAGGACAG
X83730_R2	CCGACTCACAAAAGCACCAAACAG
X95751_F2	GCTGCTGCTGCCTTAGTCTTCTCC
X95751_R2	CGGCCTCATCACACCCATTG
NtCP1_F1	GCTGCTATGGAAGGGCTACACC
NtCP1_R1	CCGCTGCAACCTTCGTCCTC

Fig. 9: Cebadores empleados en la cuantificación por PCR tiempo real. Las secuencias nucleotídicas están escritas en sentido 5'→3'.

2.7.3- Extracción de RNA total.

El proceso de purificación y manipulación RNA se realizó a 0º C. Se homogenizó 1 gr de hoja de tabaco con mortero en nitrógeno líquido. Se agregó la solución de Trizol (Tiocianato de amonio 0.4 M, Tiocianato de guanidina 0.8 M, Acetato de Sodio 0.1 M pH 5, Glicerol 5% v/v, Fenol 38% p/v en agua calidad DEPC) a 60ºC y se lo incubó durante 10 min. Luego de centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min, al sobrenadante se le agregó cloroformo hasta una concentración final de 20 % v/v. Se agitaron las muestras por 2 min y se centrifugaron durante 15 min a 13.000 rpm o hasta obtener dos fases discretas. Se tomó la fase superior y se le agregó el mismo volumen de etanol. Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente se centrifugó a máxima velocidad por 15 min para obtener un pellet blanco que corresponde a los ácido nucleicos. El pellet se lavó con etanol al 70 % y se secó en cámara de flujo laminar durante 10 min. Se resuspendió en agua tratada con DEPC y se lo incubó a 65ºC por 10 min. Luego de centrifugar nuevamente, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y se agregaron 2 volúmenes de etanol y 0.1 M de Cloruro de Sodio. Las muestras se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se volvieron a

centrifugar. Finalmente se repitió el lavado con etanol 70%, el pellet se resuspendió en agua tratada con DEPC y se almacenaron las muestras a -80°C.

2.7.4- Análisis de RNA total.

Se empleó la técnica de micro-espectrometría (Nanodrop®, ND1000) para la cuantificación del RNA obtenido y se ajustó la concentración de las muestras a 1000 ng/μl. La calidad del ARN se evaluó mediante la observación de la integridad de las bandas por electroforesis en gel de 1% agarosa.

2.7.5- Transcripción reversa.

Luego de la digestión del ADN presente en las muestras con un kit de ADNasa I recombinante (Roche®) se realizó la síntesis del ADNc (ADN complementario) a partir del RNA purificado de las hojas de tabaco. Para la transcripción inversa se empleó el kit “RevertAid™ H Minus First Strand cADN Sinthesis” de Fermentas®. Por cada μg de RNA libre de ADN se agregó 0.5 μl de oligo-dT (100 μM) y 1 μl de “hexámeros generados al azar” (100 μM), se incubó a 65°C durante 5 min para eliminar las estructuras secundarias del RNA y luego se enfrió sobre hielo. A continuación, se agregó una mezcla conteniendo 1 μl de Transcriptasa Inversa M-MuLV (20U/μl), 2 μl de mezcla de dNTPs (10mM), 1μl de inhibidor de RNAasa (20U/μl), 4 μl de buffer de reacción 4X y agua DEPC hasta llegar a los 20 μl. Luego de una agitación fuerte a 4°C se incubaron las muestras a 25°C durante 5 min, a 45°C durante 60 min y finalmente a 70°C por 5 min. El ADNc resultante se almacenó a 4°C.

2.7.6- PCR en tiempo real

Para medir la acumulación de transcritos se procedió a la amplificación en tiempo real usando el fluoróforo “*Sybr Green*” (Bio Rad®). La mezcla de amplificación empleada

fue: 5 µl de *Sybr Green*, 0.1 µl de FAM (6-carboxy-fluoresceína), 1.7 µl de agua tratada con DEPC, 0.5 µl de cada cebador (10 µM) y 2µl del ADNc correspondiente.

Dado que se empleó el método de cuantificación relativa según Pfaffl (2001), cada muestra fue analizada en diferentes concentraciones de ADNc para calcular el valor de la eficiencia de amplificación (E). Las diluciones empleadas fueron 1:4, 1:16, 1:64 y 1:256 del ADNc obtenido y se evaluó la amplificación a 57, 60 y 63.4°C dependiendo de los cebadores.

El método de Pfaffl permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen dado en relación a la expresión de un gen de referencia. La relación relativa de la expresión (R) de un gen analizado se calcula en base a la eficiencia (E) y la diferencia entre los puntos de cruce (CP, del inglés: *Crossing Point*) de la muestra desconocida y el control, expresado en comparación al gen de referencia. La eficiencia (E) de la qRT-PCR de cada transcrito fue calculado en base a la siguiente ecuación:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{pendiente}\right)}$$

Donde la pendiente se obtiene de la regresión entre la cantidad de ADN “molde” (ng de ADNc) y el número del ciclo de la qRT-PCR (CP) necesario para que la fluorescencia del *Sybr Green* se separe de la señal de fondo, y que es calculado automáticamente por el programa (BioRad, iQ5®).

R es calculado con la siguiente fórmula propuesta por Pfaffl:

$$radio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

Donde E_{target} es la eficiencia de la PCR tiempo real del transcrito a analizar, E_{ref} es la eficiencia de la PCR tiempo real del transcrito del gen de referencia, ΔCP_{target} es la diferencia de CP entre el control y la muestra, ΔCP_{ref} es la diferencia de CP entre el control y el gen de referencia.

Una vez preparadas, las placas de ELISA se centrifugaron a 8000 g y 4º C durante 5 min para finalmente colocarlas en el lector del qRT-PCR (IQ5, Bio-Rad®).

El programa térmico utilizado para los ensayos fue el siguiente: 50 °C por 2 min; 95°C por 2 min; 40 ciclos de 95°C por 2 min y 57°C por 30 s para el caso de NtCP1, NtCP23, X83730; en el caso de NtCP2 y NtCPR1 60°C por 30s y 63,4 °C por 30 s para los genes NtSAG12 y X95751. Con el fin de evaluar los productos de PCR formados y detectar posible contaminación, al final de cada programa se agregó una curva de disociación con mediciones de fluorescencia constante durante el cambio de temperatura de 55°C a 95°C. Las muestra de *cADN* se colocaron por triplicado y cada medida se realizó también por triplicado. Se incluyeron controles sin molde, a fin de evaluar la presencia de contaminación con material genético no deseado.

Desarrollo de las Vacuolas Asociadas a la Senescencia.

- Introducción

El término “Vacuola Asociada a la Senescencia” hace referencia a pequeñas vacuolas, claramente diferenciadas de la vacuola central, abundantes en células senescentes pero ausentes en hojas maduras o no-senescentes (Otegui *et al.*, 2005). Además del hecho de que las VAS no son detectables en hojas maduras, no se ha profundizado en los posibles cambios en la abundancia de estas vesículas a lo largo de la senescencia, y los factores que la modulan.

Hasta ahora se conocen las características identificatorias de las VAS (*v.g.*, marcadores de su membrana limitante, la presencia de la proteasa cisteínica SAG12, etc., Otegui *et al.*, 2005; Martínez & Costa *et al.*, 2008) y su asociación con la actividad lítica celular, especialmente proteolítica, durante la senescencia (Martínez & Costa *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, en preparación). Sin embargo, se sabe poco sobre la expresión de las VAS y la relación con la cronología de la senescencia foliar.

Los términos senescencia y PCD (del inglés, *Programmed Cell Death*) han sido empleados frecuentemente de manera indistinta, lo cual parece reflejar solamente la costumbre del uso en un grupo de investigadores dado. Como se mencionó en la introducción general, la senescencia puede estudiarse a niveles celulares y supracelulares (incluso poblacionales), mientras que la PCD se restringe sólo al proceso de muerte citológica. Por esta razón, cuando se estudia la senescencia a nivel celular también se hace referencia a la PCD (van Doorn & Woltering, 2004). Aunque desde un punto de vista amplio, la PCD podría estar contenida en el proceso de senescencia y constituir la última etapa de esta (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). La PCD es considerada como un proceso de desmantelamiento celular organizado que lleva irreversiblemente a la muerte celular. En cambio, varios autores muestran que el proceso de senescencia puede ser reversible hasta un punto denominado de “no retorno” y que este punto es bastante tardío (Krul, 1974; Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a, 1999b; van Doorn, 2005).

Mientras la expresión de la mayoría de los genes disminuye durante la senescencia (*v.g.*, genes fotosintéticos), otros aumentan. Estos últimos genes se denominan SAG (del inglés, *Senescence-Associated Gene*) y se clasifican según el

progreso de la expresión en: -1 los que poseen un nivel basal en hojas maduras y su expresión se incrementa progresivamente durante la senescencia, y -2 aquellos que sólo se expresan en la senescencia. SAG2 y SAG12 son proteasas cisteínicas, tipo Catepsinas, que pertenecen al primer y al segundo grupo respectivamente. Fueron identificadas como DNAC en hojas senescentes de *arabidopsis* (Hensel *et al.*, 1993; Lohman *et al.*, 1994). Un anticuerpo contra SAG12 diseñado en base a la secuencia predicha de aminoácidos reconoce un péptido de 38 kDa en hojas senescentes de *Arabidopsis* (Grbic, 2003). La inducción específica de esta proteasa durante la senescencia podría indicar que tiene un rol específico en la degradación de proteínas durante esta etapa. En general, las proteasas cisteínicas del tipo Catepsina son activas a pH muy bajos y están asociadas a la actividad de lisosomas o vacuolas (McGrath, 1999).

Utilizando una fusión de SAG12 con GFP se encontró que SAG12 se localiza en las VAS de hojas senescentes de *Arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005). No se conoce de qué manera esta proteasa llega a las VAS. La misma incógnita se plantea para la H⁺-Pirofosfatasa (Otegui *et al.*, 2005) y la H⁺-V-ATPasa (Gómez *et al.* en preparación) encontradas en las VAS, presumiblemente responsables de la acidificación de las mismas. Por otra parte, la presencia de clorofila, GFP dirigida a los cloroplastos, Rubisco, Glutamina Sintetasa 2 y PsaA (Martínez & Costa *et al.*, 2008) indican que al menos en parte, las VAS reclutan componentes del cloroplasto.

Como fue desarrollado en la introducción general de esta tesis, la senescencia es regulada, entre otros factores, por fitohormonas. El etileno acelera la senescencia foliar, por lo que el tratamiento con etefón (un precursor químico que libera etileno), ha sido ampliamente empleado como sistema experimental en la senescencia. En la mayoría de las especies, la aplicación exógena de etileno puede promover procesos característicos del síndrome de la senescencia: degradación de clorofila, proteínas y almidón e incremento de la actividad de algunas enzimas hidrolíticas (Mattoo & Aharoni, 1988). En el estudio de las VAS, se ha empleado el etileno para sincronizar la senescencia entre las células de un mismo tejido y así facilitar su estudio. Este tratamiento, además tiene el efecto de duplicar el número de VAS por célula (Martínez & Costa *et al.*, 2008).

Por el contrario, las citocininas retrasan el progreso de la senescencia (Gan & Amasino, 1995) e incluso pueden revertirlo (van Doorn, 2005). Se ha estudiado en profundidad la vía de señalización de las citocininas, pero hasta ahora, no se conoce cómo inhiben la degradación de los cloroplastos.

Otro factor importante para la regulación de la senescencia está vinculado con el flujo de metabolitos y con el balance de nutrientes entre órganos Fuente/Destino (Christensen *et al.*, 1981; Wittenbach, 1982). Las hojas son órganos esencialmente fuente de compuestos carbonados y nitrogenados que son transportados al resto de los órganos durante la senescencia (Feller, 1990; Crafts-Brandner *et al.*, 1996, 1998). El desarrollo de los órganos reproductivos y de las semillas actúa como un importante destino produciendo un desequilibrio del balance nutricional de la planta. En plantas de senescencia monocárpica, en una primera instancia las hojas pueden responder a la demanda aumentada de carbohidratos incrementando su capacidad fotosintética, pero luego la demanda de compuestos nitrogenados tienden a provocar el desmantelamiento del aparato fotosintético que funciona a modo de reserva de N (Noodén, 1984). Los componentes derivados de la degradación de los cloroplastos, son retranslocados como aminoácidos (*v.g.*, glutamina, asparagina), ureidos y amidas para aportar nutricionalmente al desarrollo de las estructuras reproductivas. En trigo, por ejemplo, el N reciclado desde las hojas senescentes aporta entre 20 y 70% del N cosechado en las proteínas de los granos (Peoples & Dalling 1988).

La biogénesis de las VAS ha sido una incógnita desde su descripción (Otegui *et al.*, 2005; Martínez & Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2012). Es evidente que las VAS tienen un origen al menos parcial en los cloroplastos al contener clorofila y Rubisco. Sin embargo, el aporte de otro(s) compartimiento(s) celular(es) no puede ser descartado. Esto parece ser necesario dado que las VAS poseen actividad lítica y acidez, que difícilmente puedan provenir del cloroplasto. Cualquier componente de la vía secretoria, Retículo Endoplásmico, Aparato de Golgi, o incluso la Membrana Plasmática, podrían aportar material a las VAS.

En este capítulo se abordará el desarrollo de las Vacuolas Asociadas a la Senescencia, en distintos estadios del proceso, y el efecto de las fitohormonas y la

glutamina como moduladores de la formación de VAS. Además se mostrarán resultados que implican al Aparato de Golgi en la biogénesis de las VAS.

-Resultados

3.1 - Descripción del modelo de estudio: senescencia inducida por corte y oscuridad.

Un sistema sencillo empleado en estudios de senescencia foliar consiste en separar las hojas de la planta, tratarlas con un precursor de etileno, denominado etefón, y almacenarlas en oscuridad. En este modelo de trabajo, la senescencia es inducida por el corte y la oscuridad y sincronizada a nivel tisular por el tratamiento hormonal. El modelo de senescencia inducida permite trabajar en un sistema relativamente homogéneo y reproducible.

En general para evaluar el progreso de la senescencia se monitorea la degradación de clorofila y de proteínas, ya que son los síntomas más evidentes de este proceso (Noodén, 1988). La Figura 1 muestra el patrón general de degradación de clorofilas (estimadas como unidades de SPAD) y de proteínas (mediante electroforesis y tinción con *Coomassie Brilliant Blue*) a medida que avanza la senescencia de hojas de tabaco separadas de la planta, tratadas con etefón y almacenadas en oscuridad. Se observó que la degradación de clorofilas se acelera luego de 2 días en oscuridad, al caer a la mitad las unidades de SPAD registradas entre el día 2 y el 6 de almacenamiento (Fig. 1A). Las proteínas más abundantes de las hojas comenzaron a degradarse antes, ya que luego de 3 días de almacenamiento en oscuridad, las bandas en el gel de electroforesis, correspondientes a las subunidades pequeña y grande de Rubisco disminuyeron de manera apreciable (Fig. 1B).

En la presente tesis, se empleó el modelo experimental descrito para el estudio de la senescencia y sólo en algunos casos se cambiará el mecanismo de inducción de acuerdo al objetivo del experimento.

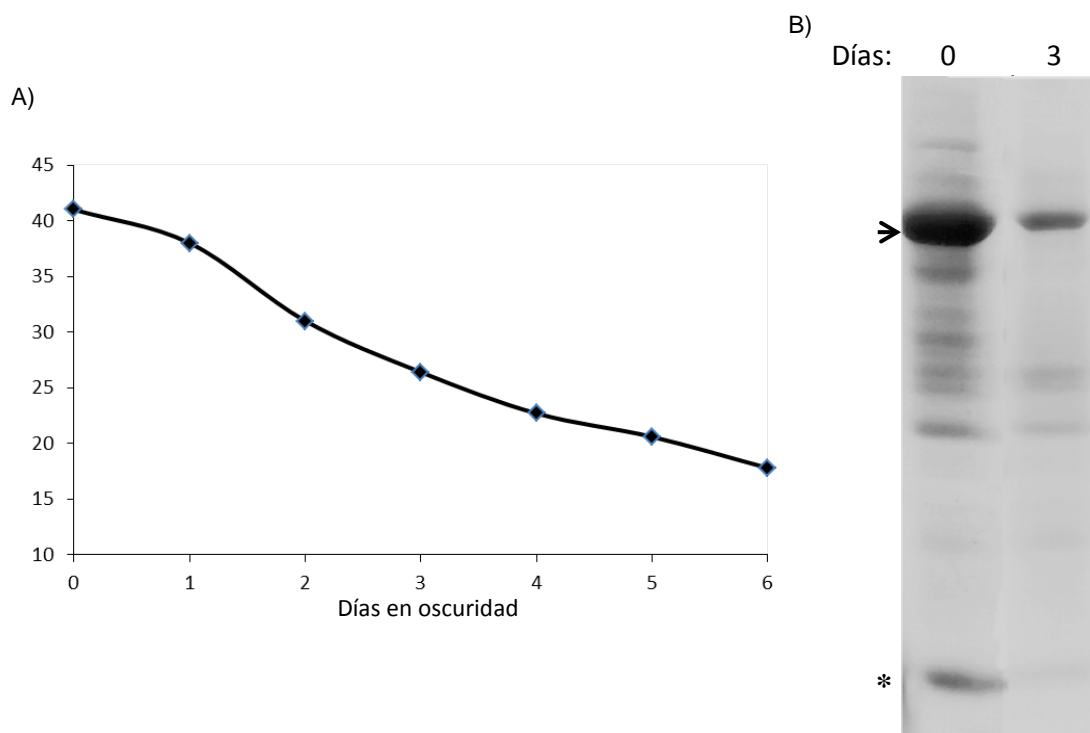


Figura 1: Degradación de clorofila y proteínas durante la senescencia inducida de hojas. A) Contenido de clorofilas medido como unidades de SPAD de hojas cortadas de la planta (día 0), tratadas con etefón e incubadas en oscuridad durante 6 días. B) Degradación de proteínas (extracto crudo) entre el día 0 y 3 de almacenamiento en oscuridad de las mismas hojas de tabaco del panel A (la flecha señala a la subunidad grande de Rubisco y el asterisco a la subunidad pequeña de Rubisco).

3.2 - Cambios en la abundancia de las VAS en el curso de la senescencia inducida.

Con el objetivo de seguir el cambio en la abundancia de las VAS durante la senescencia, se trataron hojas cortadas de la planta con etefón y se incubaron durante 2 a 6 días en oscuridad para luego realizar observaciones mediante microscopía confocal. Células aisladas y pequeños fragmentos de hojas fueron incubados con *Lysotracker Red* (Munafo & Colombo, 2001) para marcar las VAS por su acidez (Otegui *et al.*, 2005). Las observaciones se realizaron cada 24 h durante 6 días de senescencia inducida.

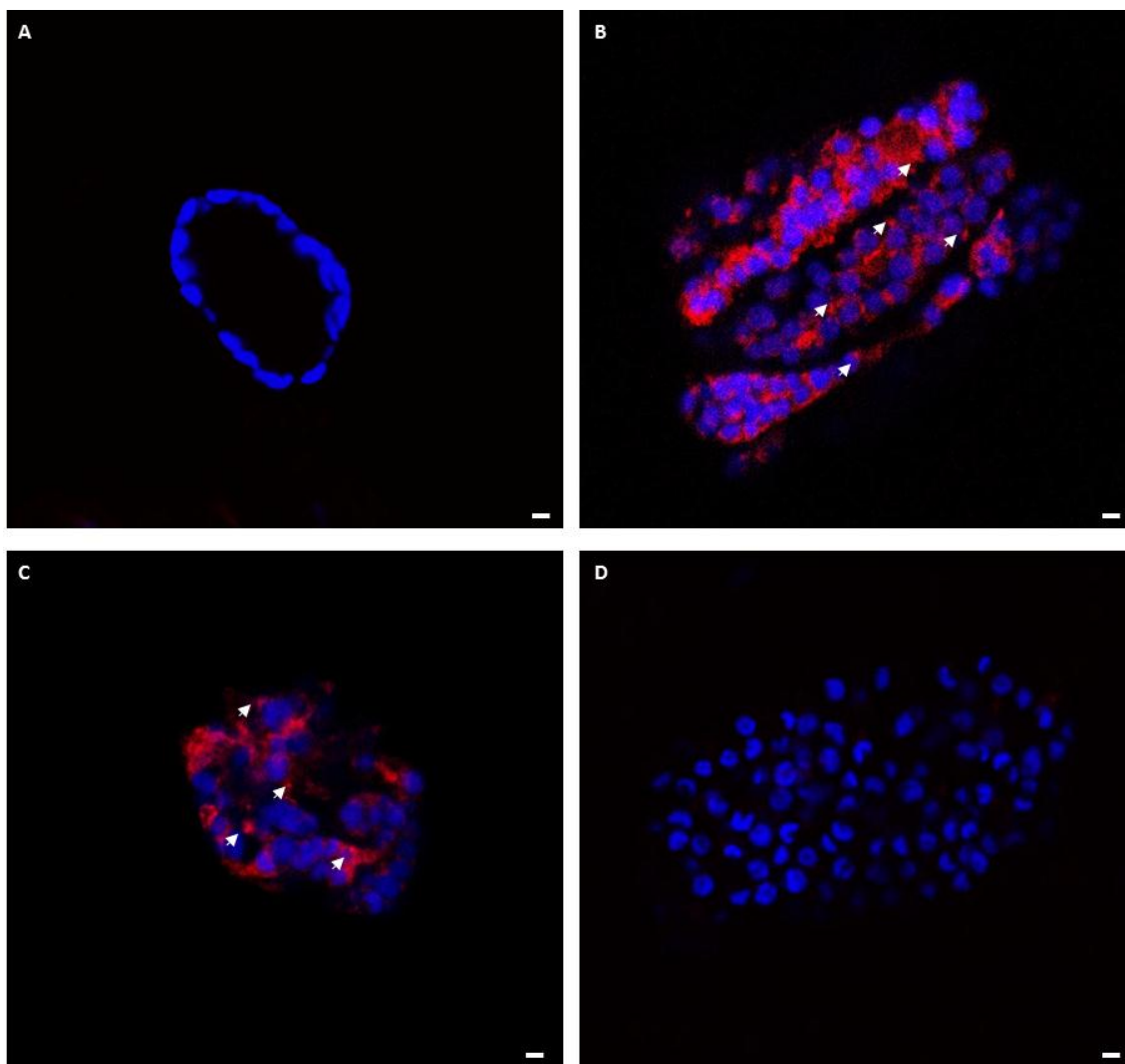


Figura 2: Cambios en la abundancia/presencia de VAS en células de tabaco aisladas en distintos estadios de la senescencia. Células del mesófilo de hojas inducidas a senescer con etefón e incubación en oscuridad durante 0 (A), 2 (B), 4 (C) y 6 días (D). Imágenes de microscopía confocal pseudocoloreadas. Azul: clorofila; Rojo: *Lysotracker Red*. Las flechas muestran algunas VAS. Barra: 5 μm .

La Figura 2 muestra células aisladas del mesófilo de hojas de tabaco a los 0, 2, 4 y 6 días desde la inducción de la senescencia. Las VAS son indetectables en las hojas maduras (día 0), pero la abundancia de las VAS aumenta hasta un máximo entre los días 2 y el 4 de tratamiento (Figs. 2 B y C). Este patrón de aparición de las VAS se repite en las observaciones realizadas en trozos de tejido de las mismas hojas (Fig. 3). La señal de clorofila (azul) disminuye con la senescencia y la morfología de los cloroplastos se modifica. En las hojas maduras del día 0 los cloroplastos tienen una forma ovoidea típica de cloroplastos maduros (Fig. 2A). A medida que la senescencia

transcurre, los cloroplastos disminuyen de tamaño y adoptan una forma cóncava característica de esta etapa (Fig. 2D).

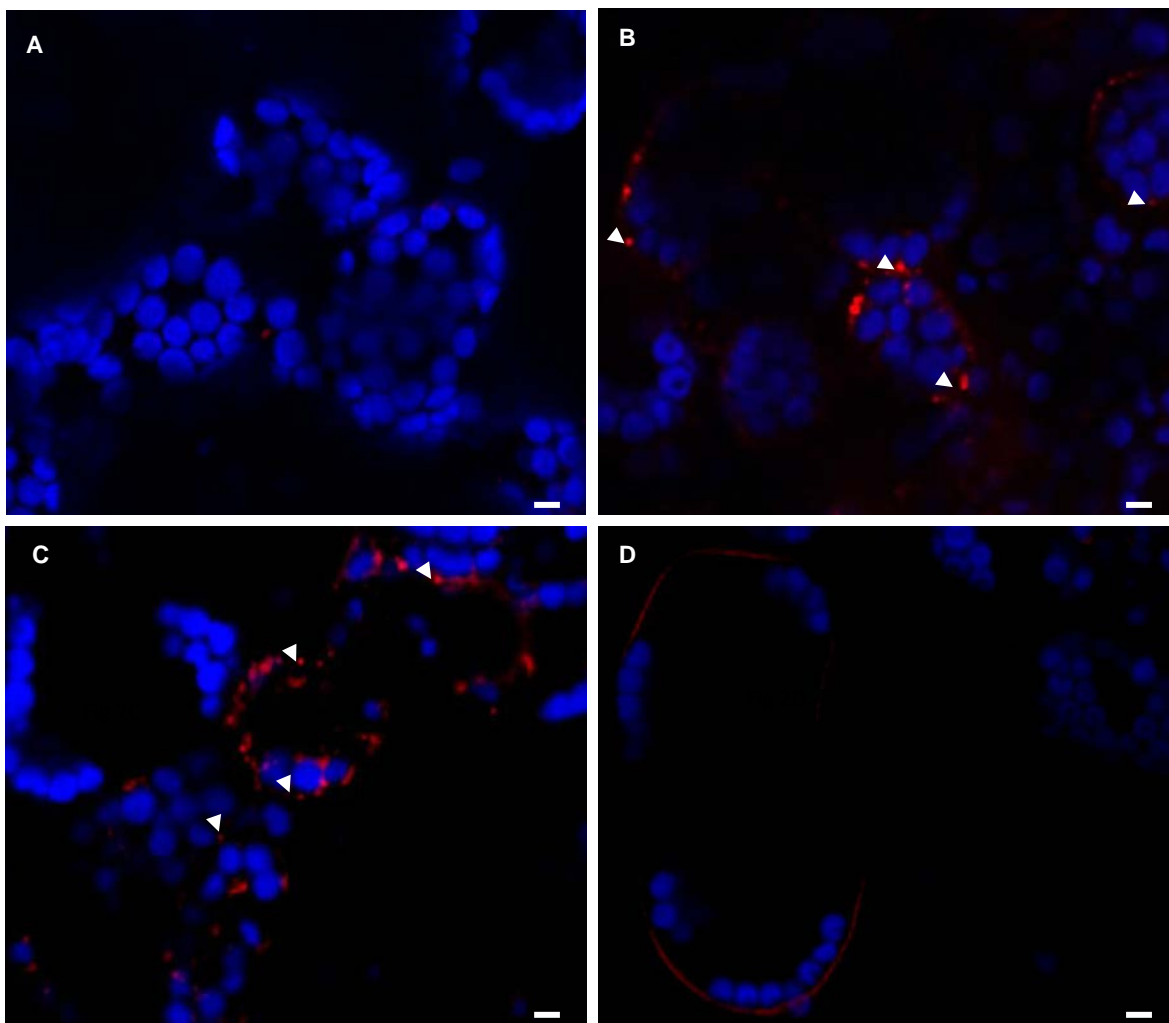


Figura 3: Progreso de la senescencia de hojas de tabaco. Fragmentos de hojas inducidas a senescer con etefón e incubación en oscuridad durante 0 (A), 2 (B), 4 (C) y 6 días (D). Imágenes de microscopía confocal pseudocoloreadas. Azul: clorofila; Rojo: *Lysotracker Red*. Las flechas muestran algunas VAS. Barra: 5 μ m.

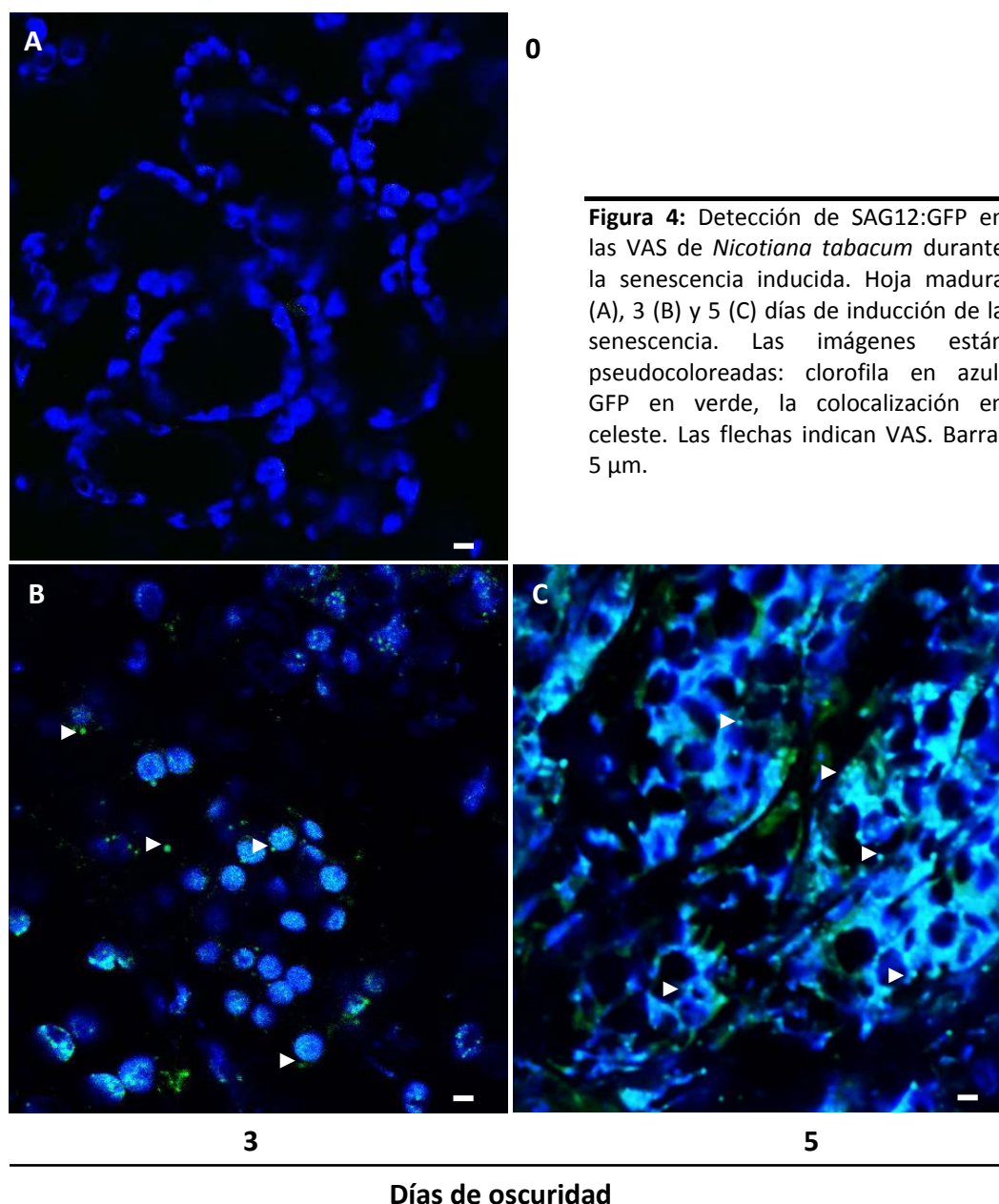
En el primer experimento (Fig. 2) se usaron células dado que la marcación con *Lysotracker Red* es más homogénea en este sistema, es decir, todas las células están expuestas de la misma manera al fluoróforo. Sin embargo, es posible que la manipulación para la obtención de células modificara el estado fisiológico de las células. Por esta razón el ensayo también se realizó con fragmentos de hojas (Fig. 3) que confirmaron el resultado obtenido con células, es decir, las mayores cantidades de

VAS se detectaron en las muestras observadas en los días 2 y 4 desde el inicio de la inducción.

3.3 - Presencia de SAG12-GFP durante el desarrollo de las VAS.

Para confirmar el incremento en la abundancia de VAS durante la senescencia, se empleó una línea de *Nicotiana tabacum* que expresa la proteasa cisteínica SAG12 fusionada a GFP bajo control del promotor natural de SAG12 (Carrión *et al.*, en preparación). Previamente, la fusión SAG12:GFP había sido localizado en las VAS de *Arabidopsis thaliana* (Otegui *et al.*, 2005). El objetivo de este ensayo fue seguir la abundancia de las VAS empleando SAG12-GFP durante las etapas iniciales de la senescencia foliar y para eso se realizaron observaciones durante 6 días después de la inducción de la senescencia en oscuridad de hojas cortadas de la planta.

En la Figura 4 se muestran microfotografías de hojas observadas por microscopía confocal del día 0, 3 y 5 del tratamiento inductivo. Se observaron VAS marcadas con GFP (SAG12) en el día 3, pero no en hojas maduras (día 0). En los cloroplastos, también se detectó señal de GFP, aunque con menor intensidad que en las VAS, durante el mismo periodo. A partir del quinto día, la señal de la clorofila y GFP se encuentra fuera los cloroplastos aunque aún permanece en algunas VAS. Este patrón también fue encontrado en otros experimentos donde después del día 6 se detectó clorofila fuera de los cloroplastos. En secciones ópticas sucesivas, se encontró que esta señal ocupa la mayor parte del volumen de la célula. Sin embargo, mediante estas observaciones no se pudo identificar la localización subcelular de la señal de SAG12:GFP que se encuentra por fuera de las VAS en el día 5 del tratamiento.



3.4 - La aparición de las VAS se corresponde con el período de mayor degradación de los componentes cloroplásticos.

En las mismas hojas de tabaco empleadas en el seguimiento de la abundancia de las VAS (Figs. 2 y 3), se analizaron tres parámetros diagnósticos de la senescencia foliar: pérdida de proteínas totales mediante la técnica de SDS-PAGE y tinción con *Coomassie blue* (Fig. 5), estimación del contenido de clorofila con SPAD y estimación del rendimiento cuántico potencial del fotosistema II mediante el fluorímetro “*Imaging PAM*” (Fig. 6).

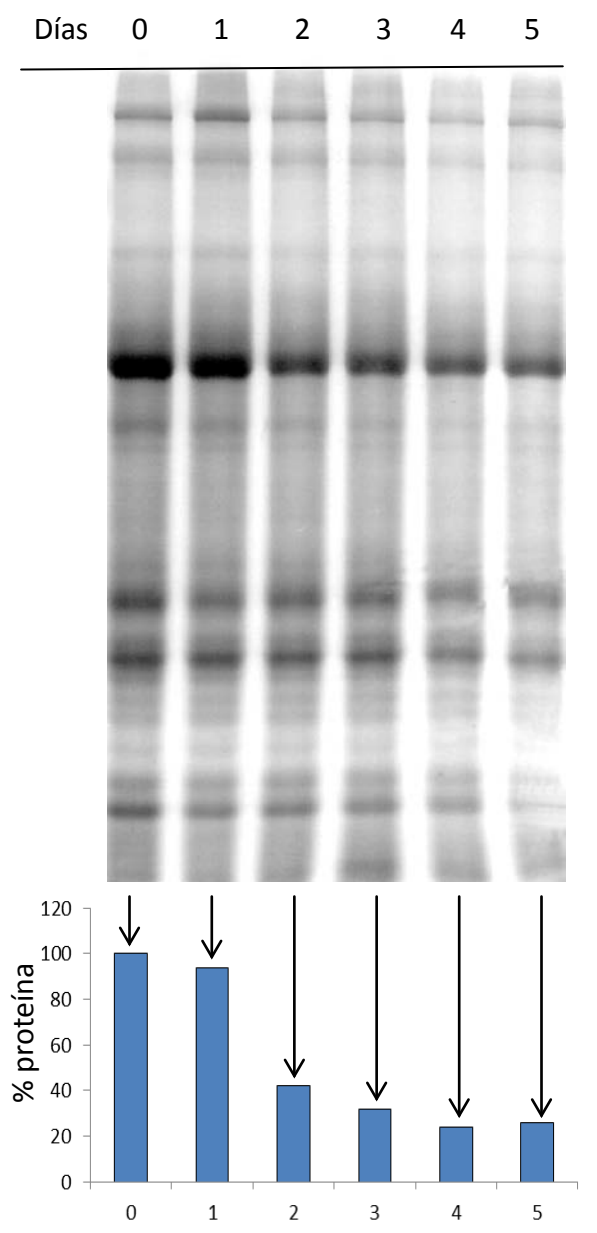


Figura 5: Degradación de proteínas durante la senescencia foliar desde el día 0 (hoja madura) hasta el día 5 en oscuridad. Proteínas teñidas con *Coomassie blue* en gel SDS-PAGE. Las proteínas se normalizaron por unidad de superficie foliar. En el gráfico se muestra el porcentaje de proteína remanente en relación a la hoja madura (día 0).

El contenido de proteínas muestra una disminución abrupta en el segundo día de incubación en oscuridad mientras que la mayor caída de los valores de SPAD y rendimiento cuántico ocurre entre los días 2 y 4 del tratamiento (Fig. 6). Este periodo (días 2 – 4) se corresponde con el de mayor abundancia de VAS en las células, como muestran las microfotografías confocales (Figs. 2 y 3). Es interesante notar que la tasa de caída en el contenido de proteína y clorofila se atenúa luego del cuarto día de tratamiento, cuando la abundancia de las VAS disminuye.

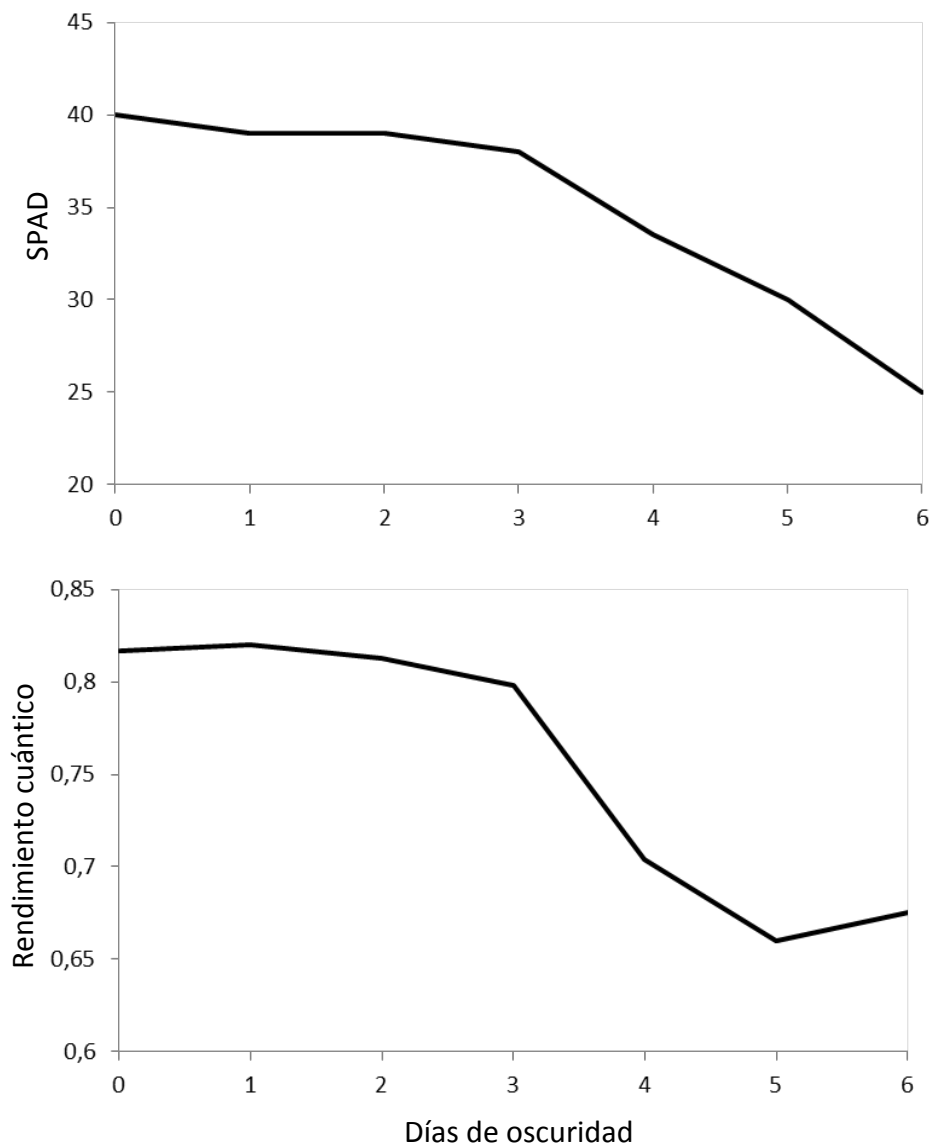


Figura 6: Cambios en los valores de SPAD (gráfico superior) y rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (gráfico inferior) durante la senescencia de hojas incubadas en oscuridad.

El rendimiento cuántico potencial del fotosistema II muestra valores normales (ligeramente superiores a 0,8) para una hoja madura, no senescentes, pero decrece fuertemente entre el día 2 y 4 de senescencia para estabilizarse después de los 5 días de tratamiento de oscuridad (Fig. 6, gráfico inferior).

3.5 - Correlación entre la expresión de genes asociados a la senescencia y el desarrollo de las VAS.

La proteasa cisteínica SAG12 es uno de los marcadores moleculares más ampliamente usados para seguir el progreso de la senescencia foliar, dado que su expresión es prácticamente indetectable en hojas no senescentes, y aumenta marcadamente acompañando el proceso de dismantelamiento del aparato fotosintético (v.g., Lohman *et al.*, 1994; Gombert *et al.*, 2006). La fusión de SAG12 con el fluoróforo GFP permitió localizar esta proteasa en las VAS de *Arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005) y de tabaco (Carrión *et al.*, en preparación).

Por su parte, la proteasa cisteínica NtCP1 también es específica de la senescencia en tabaco (Beyene *et al.*, 2007) y posee un nivel de similitud en la secuencia bastante elevada con SAG12.

En la Figura 7 se muestran los niveles de transcripción relativa de las proteasas SAG12 (HQ108340) y NtCP1 (AY881011) que se registraron en las mismas hojas que se emplearon para estudiar los cambios en la abundancia de las VAS (Figs. 2 y 3). Para la estimación relativa del nivel de expresión de estos genes se tomaron como referencia a los genes EF1- α y PP2-A los cuales muestran un nivel de expresión constante a lo largo del desarrollo en *Nicotiana tabacum* (Schmidt *et al.*, 2010). Las dos proteasas, consideradas marcadores moleculares de la senescencia, tienen un patrón de expresión que aumenta sustancialmente en coincidencia con el pulso de VAS y el periodo de mayor actividad lítica durante la senescencia de las hojas de tabaco.

En la Figura 8 se muestra el patrón de expresión de la subunidad C de la H⁺ -ATPasa vacuolar (X95751). Esta proteína fue encontrada en un perfil proteómico parcial de las VAS de tabaco (Gómez *et al.*, en preparación). De la misma manera que con SAG12 y NtCP1, la expresión de la subunidad C de la H⁺ -ATPasa vacuolar aumentó en el segundo día y decayó hacia el sexto día de la inducción de la senescencia.

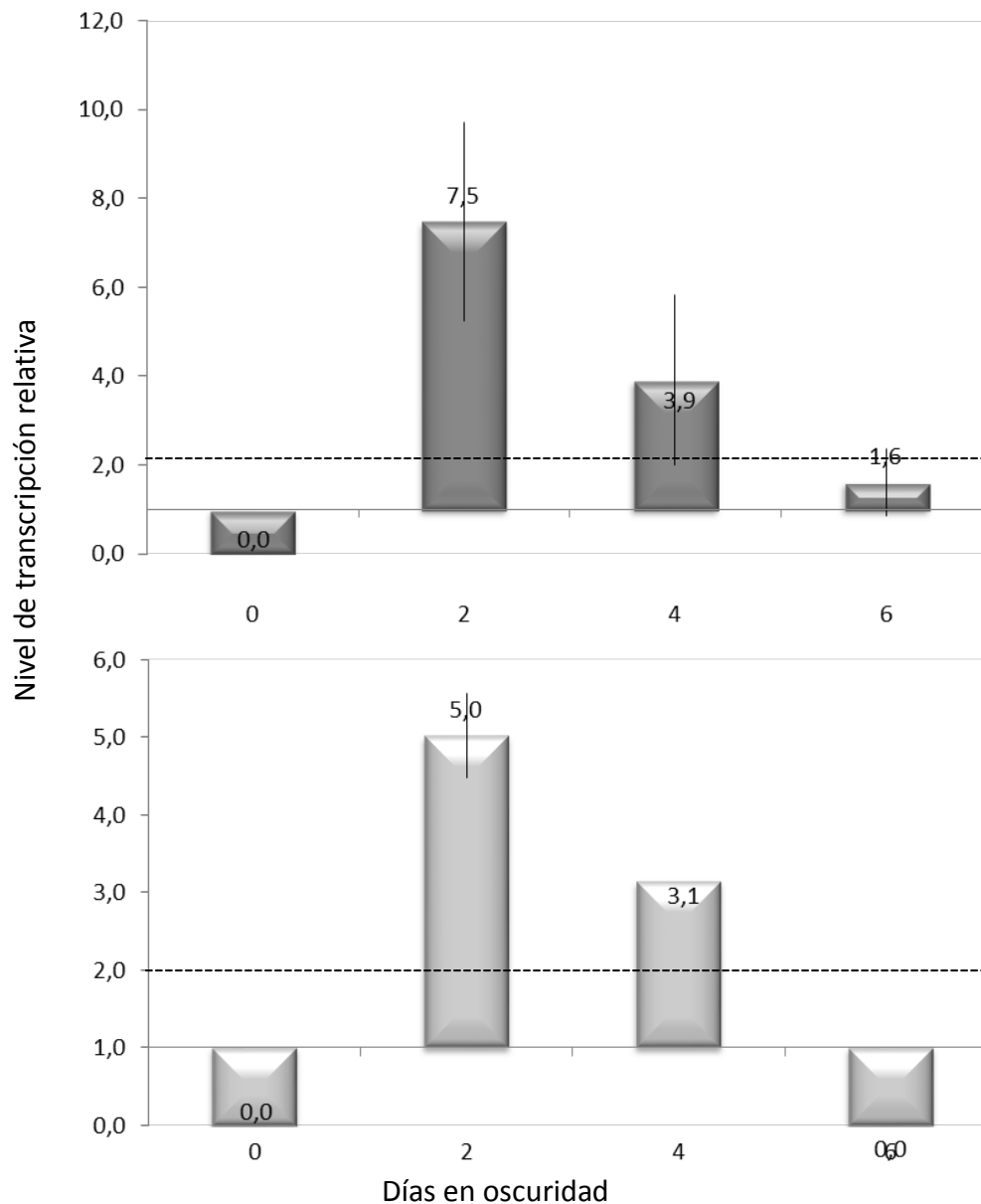


Figura 7: Niveles de expresión relativa de SAG12 (panel superior) y NtCP1 (panel inferior) durante la senescencia inducida en hojas de tabaco. La línea de puntos demarca la significancia mínima para considerar un aumento de expresión.

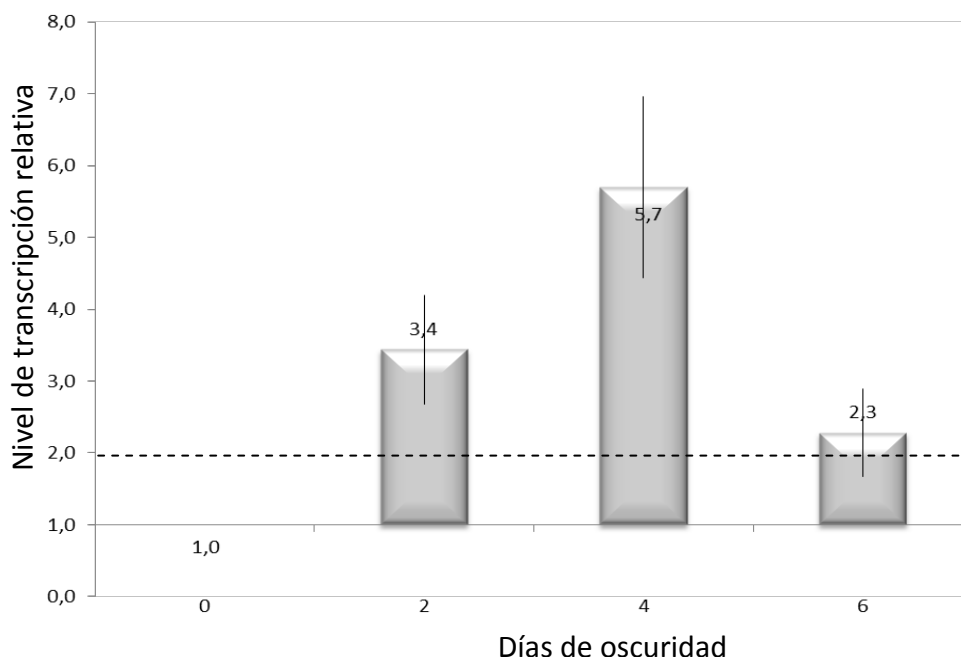


Figura 8: Niveles de expresión relativa de la subunidad C de la H^+ -ATPasa vacuolar durante la senescencia inducida en hojas de tabaco. La línea de puntos indica la significancia mínima para considerar un aumento de expresión.

3.6 – Acidificación de la fracción enriquecida en VAS durante la senescencia.

Las VAS pueden ser aisladas por centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa a partir de extractos de hojas senescentes (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Como se mostrará en el capítulo IV, la fracción 3 de ese gradiente está enriquecida en VAS y por esta razón se la denomina F3. Para poder visualizar la F3, el extracto crudo se pre-incuba con Rojo Neutro, un marcador de compartimientos ácidos. Para analizar la variación de la F3 durante la senescencia, se realizaron fraccionamientos de VAS cada 8 h durante los primeros tres días de tratamiento con etefón y oscuridad en hojas de tabaco. La Figura 9 muestra la secuencia de fraccionamientos observados con luz UV y visible. Entre las 48 y 54 h se detecta el pico de mayor abundancia/acidez en la F3 evidenciado con luz UV, de color rojo brillante (el pico de emisión de fluorescencia del rojo neutro se sitúa alrededor de 600 nm), y con luz visible de color pardo.

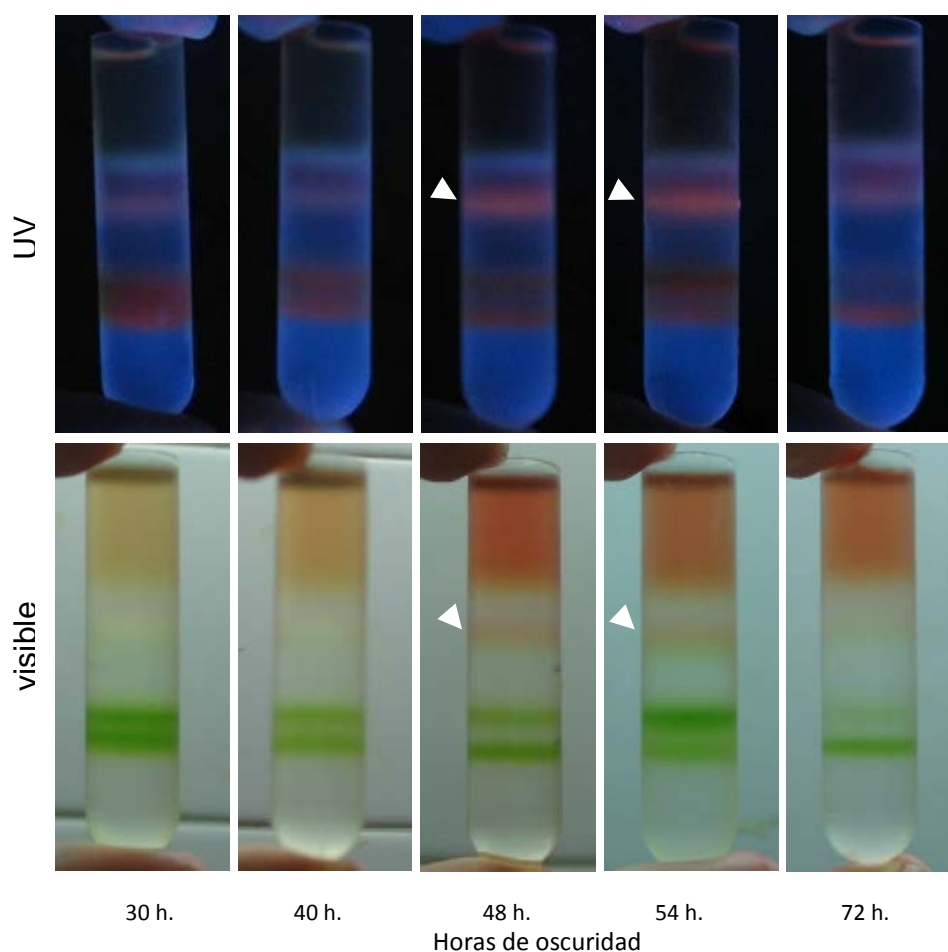


Figura 9: Secuencias de aislamientos de VAS durante la senescencia foliar en *Nicotiana tabacum*. Con flechas se señala a la F3, fracción enriquecida en VAS.

3.7 - Efecto del etileno y las citocininas sobre el desarrollo de las VAS.

Como se trató en la introducción general de esta tesis, las fitohormonas tienen un importante papel en la regulación de la senescencia (Noodén & Leopold, 1988). Las citocininas retrasan la senescencia de órganos e incluso pueden revertirla. Por su lado, el etileno acelera la senescencia en órganos maduros y actúa como un modulador positivo del proceso.

Se evaluó el efecto del etileno y las citocininas en la aparición de las VAS en hojas de tabaco cortadas e incubadas en oscuridad. Un grupo de hojas fue asperjado con 20 ppm de Bencil-amino-purina (BAP, una citocinina sintética), otro grupo con 100

ppm de etefón, mientras un tercer grupo que no tuvo tratamiento fue empleado como control.

La Figura 10 muestra las variaciones en el patrón y contenido de proteínas (SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*), y en la Figura 11 el contenido de clorofila de las hojas de tabaco luego de 3 días de oscuridad. Se puede observar una marcada disminución en el contenido de proteínas y clorofila en el tratamiento con etefón. En cambio, la aplicación de BAP impidió o retrasó la degradación de proteínas y clorofila.

En las hojas tratadas con BAP sólo se registró una caída en el contenido de proteína del 13% respecto a la hoja madura (día 0), mientras que en el tratamiento con etefón la caída fue del 60% luego de tres días en oscuridad (Fig. 10). Lo mismo ocurrió con la degradación de clorofila, es decir, el tratamiento con etefón aceleró marcadamente la pérdida de clorofila (Fig. 11).

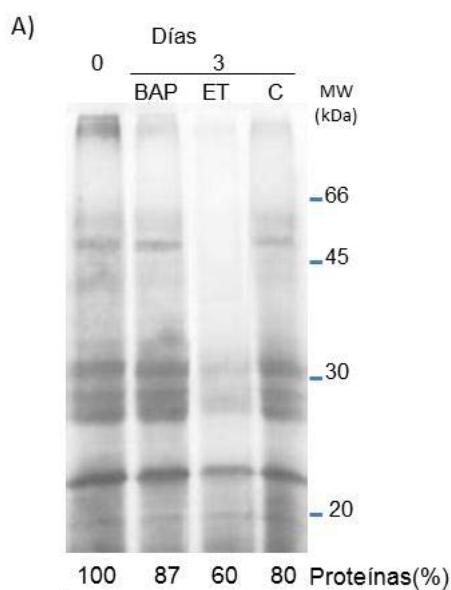


Figura 10: Efecto de las citocininas y etefón en el contenido de proteínas (A) durante la senescencia foliar de *Nicotiana tabacum*. Bencil-amino-purina: BAP, Etefón: ET. Debajo de la imagen A se muestra el contenido porcentual de proteína respecto al día 0.

Pequeñas secciones de hojas de los tratamientos con hormonas y del control fueron incubados con *Lysotracker Red* y observados mediante microscopía confocal (Fig. 12). Luego de 3 días de incubación en oscuridad, en las hojas tratadas con etefón se observaron numerosas VAS rodeando a los cloroplastos (Figs. 11 y 12C) al igual que en el control sin hormonas (Fig. 12B). Pero en el tratamiento con BAP, no se detectaron VAS mediante *Lysotracker Red*. De hecho, los cloroplastos no muestran signos de senescencia (intensidad de la señal de clorofila y posición relativa) (Fig.

12D).

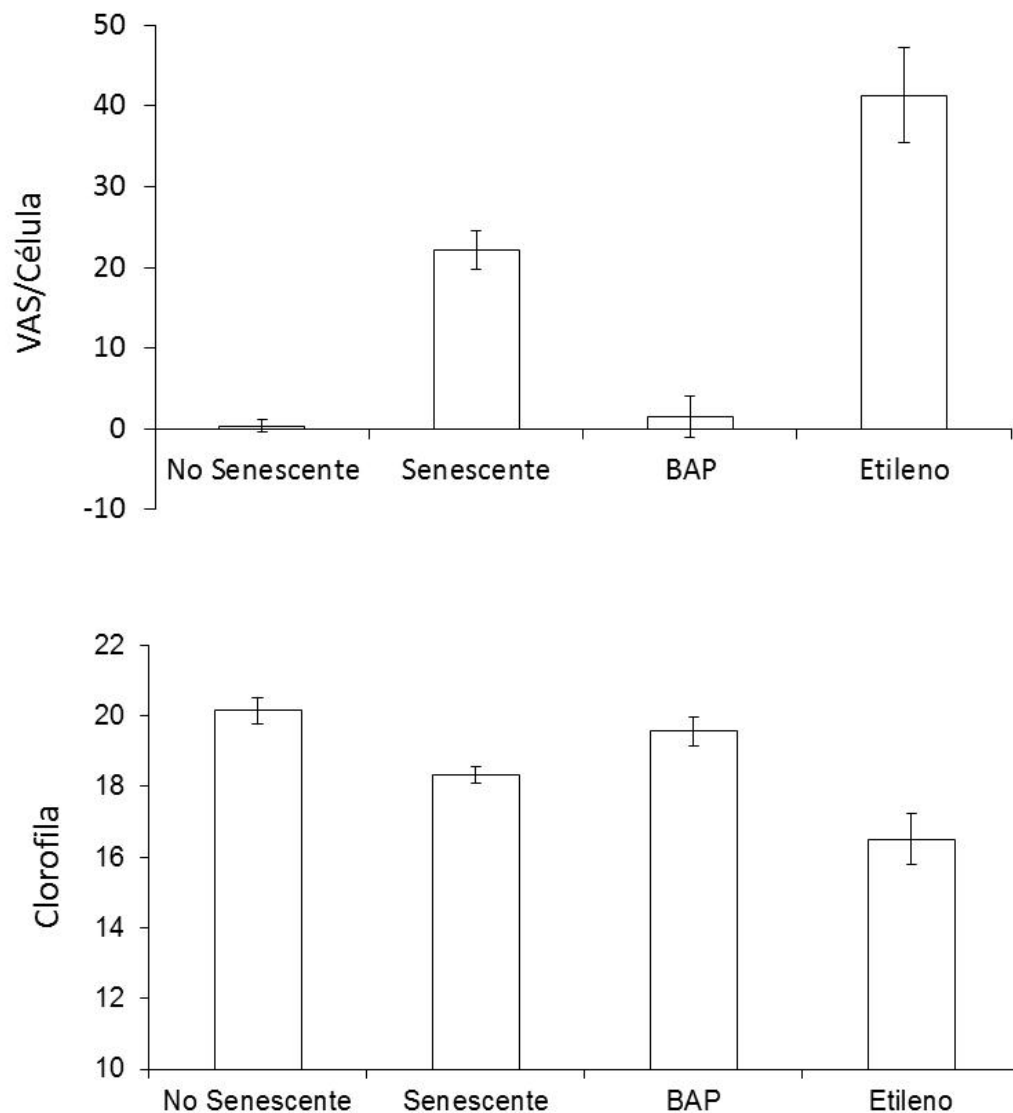


Figura 11: Efecto de las citocininas y etefón en la abundancia de VAS (número de VAS por célula en una sección óptica de aproximadamente 1 μm de espesor, gráfico superior) y en el contenido de clorofila (gráfico inferior) durante la senescencia foliar de *Nicotiana tabacum*. Bencil-amino-purina: BAP. Las barras verticales indican el error estándar de la media.

Estos resultados indicarían que la aparición de las VAS está regulada por el efecto de las citocininas y etefón, y confirma que la abundancia de las VAS se relaciona con el ritmo de degradación de clorofila y proteínas.

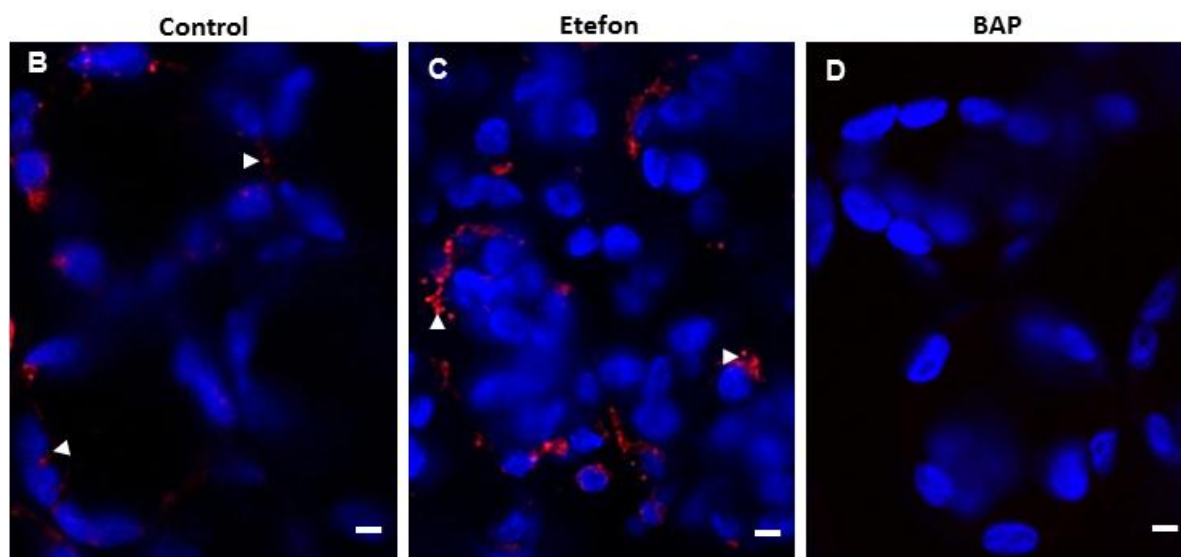


Figura 12: Efecto de las citocininas y el etefón en la aparición de VAS en hojas senescentes de tabaco. Microfotografías confocales pseudocoloreadas: en azul la clorofila y en rojo el *Lysotracker Red*. Las flechas señalan VAS marcadas con *Lysotracker Red*. Barra: 5 μ m.

3.8 – La adición exógena de Glutamina inhibe la aparición de VAS.

El estado nutricional de la planta es un regulador importante de la senescencia. Durante el desarrollo de los órganos reproductivos, particularmente las semillas, el balance de nutrientes entre órganos “Fuentes/Destinos” se modifica (Tollenaar & Daynard, 1982; Miao *et al.*, 2009) y esto es un factor importante en la regulación de la senescencia foliar. Los órganos “Destino” demandan compuestos nitrogenados que son suministrados por las hojas en forma de aminoácidos producto de la degradación de proteínas. Dado que la glutamina es una forma importante de transporte de nitrógeno desde las hojas senescente hacia los órganos destinos, es posible que la glutamina pueda tener un rol modulando el ritmo de la senescencia y la aparición de VAS.

Para evaluar el efecto de la glutamina sobre la aparición de las VAS, se incubaron discos de tabaco de hojas maduras en una solución con 10 mM de L-Glutamina y se midió la pérdida de clorofila y proteínas totales luego de 48 y 72 h en oscuridad (Fig. 13). La Figura 13 muestra el contenido de clorofila y proteínas para las muestras tratadas y para los controles (sin tratamiento con Glutamina). La Glutamina retrasó significativamente la pérdida de clorofila, reteniendo hasta los 4 días de oscuridad casi totalmente los valores de SPAD de la hoja madura. La degradación de proteínas también fue menor en las muestras tratadas con glutamina respecto a los

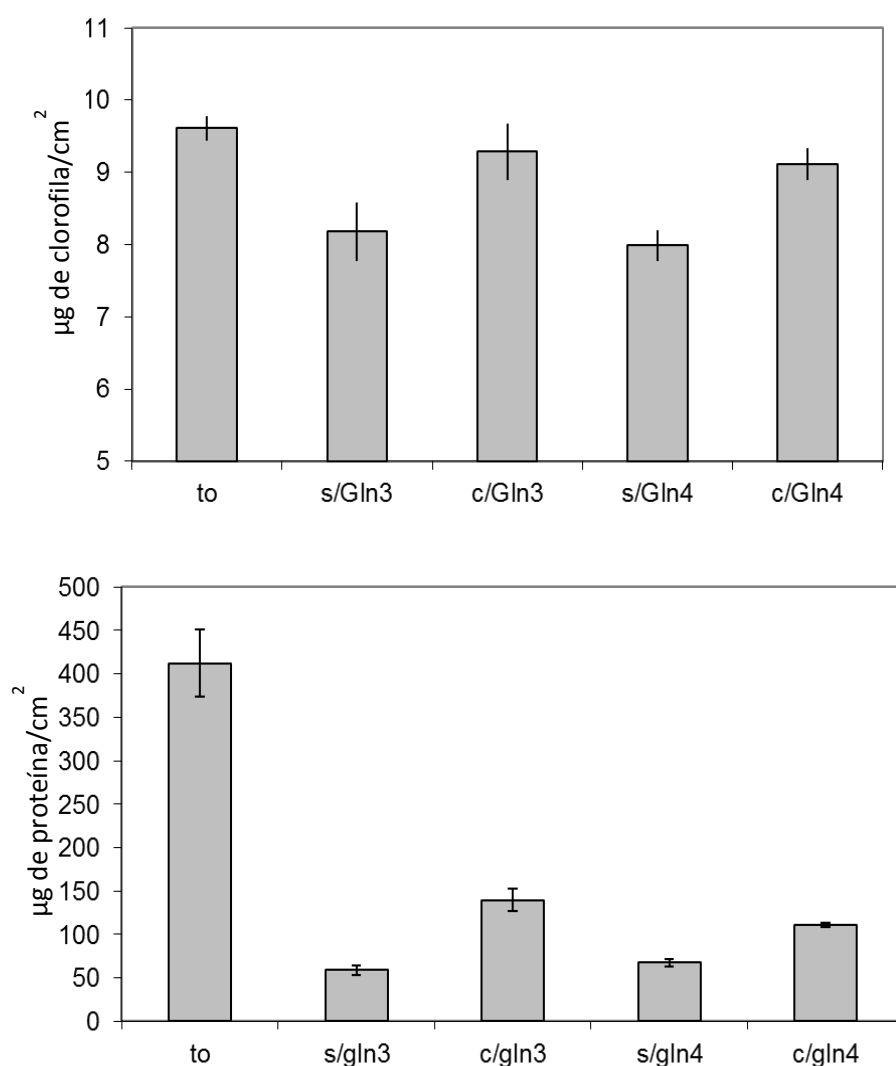


Figura 13: Retraso de la caída del contenido en clorofila (gráfico superior) y proteínas (gráfico inferior) de discos incubados con glutamina (c/gln) y control (s/gln) en oscuridad durante 3 y 4 días. Las barras representan el desvío estándar.

controles. A pesar de que el contenido de proteínas disminuyó significativamente en ambos casos, las muestras tratadas conservaron mayor cantidad de proteínas (casi el doble) al final del experimento respecto al control (Fig. 13).

Los discos tratados y controles fueron empleados para obtener células y detectar VAS mediante la marcación con *Lysotracker Red* utilizando microscopía de epifluorescencia. La Figura 14 muestra que en el tratamiento con glutamina no se detectan VAS, sin embargo, las VAS son abundantes en el control. En el canal de la clorofila de las células control se observan, además de los cloroplastos, VAS con señal de clorofila y *Lysotracker Red*.

Estos datos sugieren que la presencia de Glutamina inhibe o al menos retrasa los síntomas de la senescencia inducida por oscuridad y que esto se correlaciona con la ausencia de VAS detectables con *Lysotracker Red*.

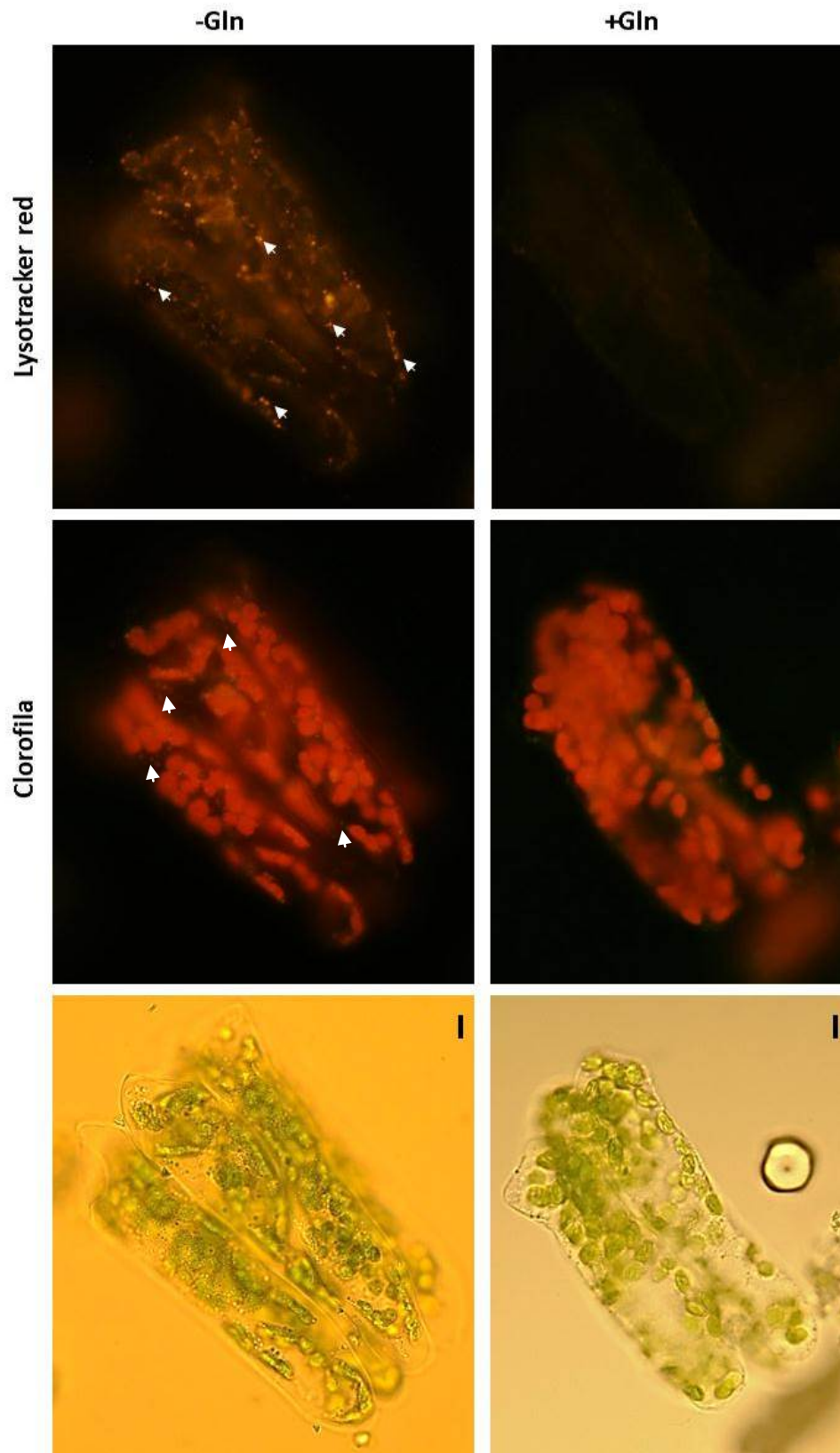


Figura 14: Efecto inhibitorio de la glutamina sobre la aparición de las VAS. Células obtenidas de discos de hojas de tabaco incubados con Glutamina (+Gln) y controles (-Gln) durante 3 días en oscuridad. Las flechas señalan VAS marcadas con *Lysotracker Red*. Microscopía de Epi-fluorescencia. Barras: 10 μ m.

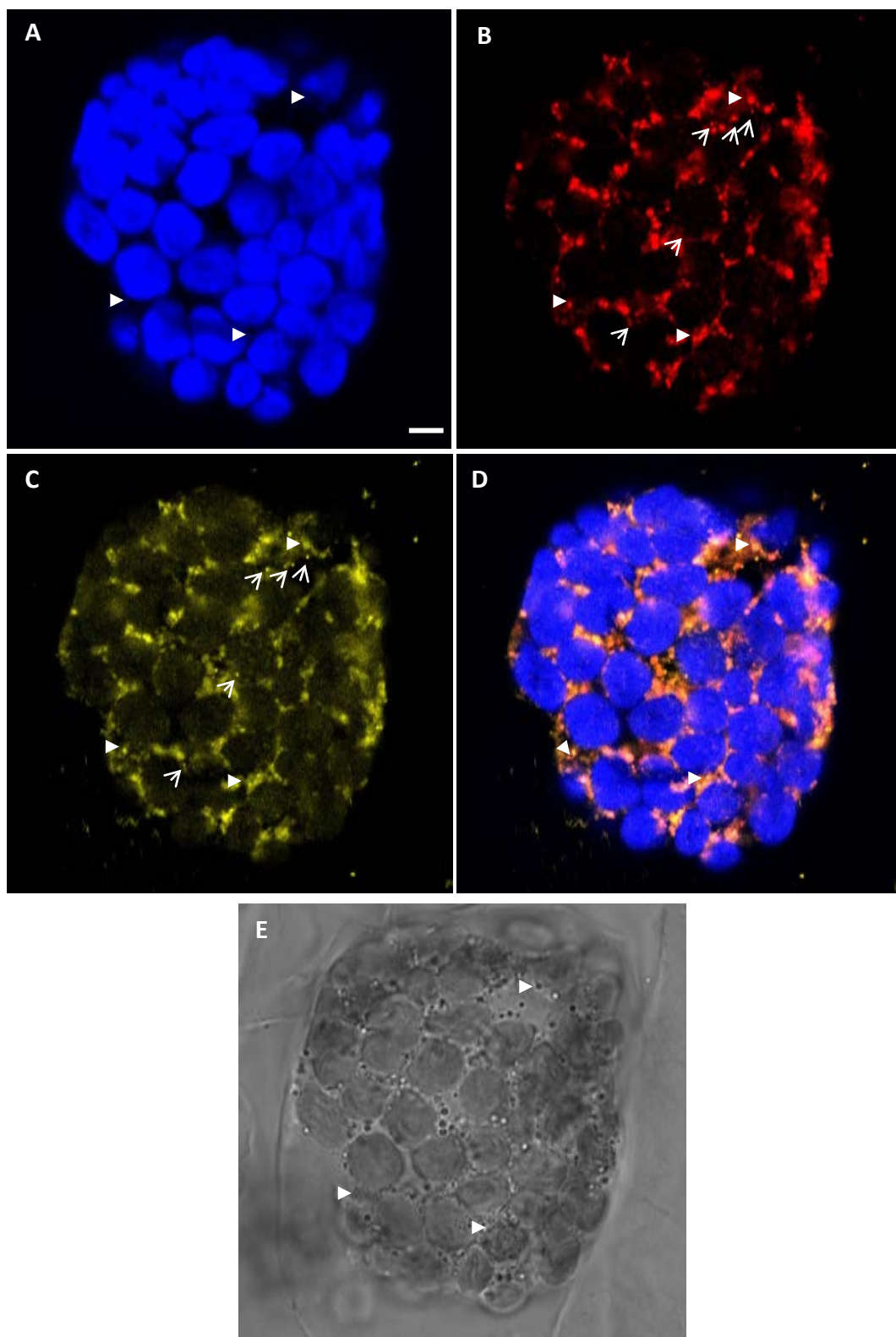
3.9- Una fusión del dominio trans-membrana de la Manosidasa I fusionado a YFP se localiza en las VAS.

Comprender el origen de las VAS es esencial para definir apropiadamente este compartimiento. Además, el conocimiento sobre la ontogenia de las VAS podría facilitar la comprensión de su función durante la senescencia. Las VAS poseen entre otros componentes cloroplásticos, el pigmento clorofila, el cual es fácilmente detectable mediante microscopía confocal. La presencia de clorofila y de Rubisco en las VAS, indican que estas reclutan componentes cloroplásticos.

En la caracterización bioquímica de las VAS (Martínez & Costa *et al.*, 2008) se detectó actividad de la enzima Manosidasa (un marcador del aparato de Golgi), con valores cercanos a la mitad de la actividad registrada para el extracto crudo de hojas. Este resultado sugiere la participación del Golgi en el origen de las VAS, dado que la actividad manosidasa es esencial en vesículas post-golgi que están dirigidas hacia la vacuola central (Hutchins & Klionsky, 2001; Huang & Klionsky, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2010).

Para evaluar si el Aparato de Golgi está involucrado en las VAS, se empleó una línea de *Arabidopsis thaliana* que expresa el dominio transmembrana de la α -1,2-Manosidasa I fusionado con la proteína fluorescente YFP, con localización en el cis-Golgi (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2006).

La Figura 15 muestra una célula aislada de una hoja senescente, tratada con *Lysotracker Red*, donde se detectan numerosas VAS rodeando los cloroplastos que además co-localizan con YFP (fusionada con la manosidasa I). La co-detección de clorofila (azul), *Lysotracker Red* (rojo) y manosidasa I (amarillo) en vesículas de aproximadamente 1 μ m, sugiere que las VAS podrían tener, al menos parcialmente, un origen en el aparato de Golgi. Estas observaciones también se realizaron mediante microscopia de epifluorescencia, con los mismos resultados (Fig. 16). En hojas no senescentes el patrón de fluorescencia de YFP varía, mostrando estructuras alargadas y ovoides correspondientes al aparato de Golgi, que no colocan con *Lysotracker Red* (indetectable) ni con clorofila (Fig. 17).



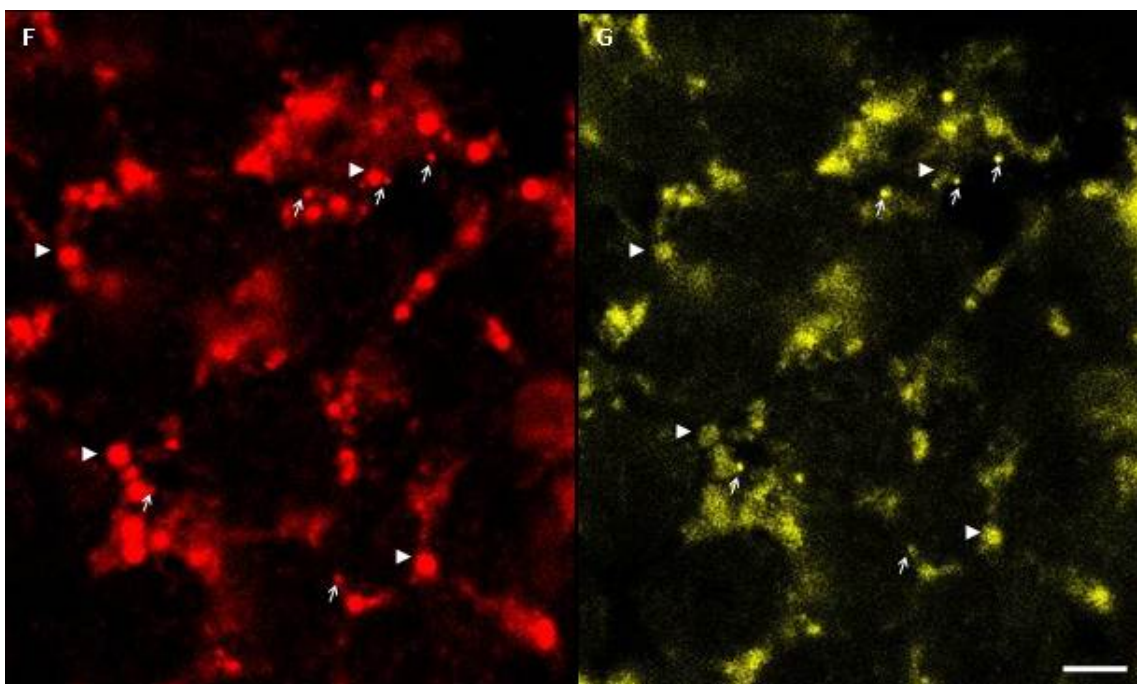


Figura 15: Detección de Manosidasa I en las VAS. Colocalización de clorofila (A, azul); *Lysotracker Red* (B, rojo); Manosidasa I:YFP (C, amarillo) en las VAS de hojas senescentes de *Arabidopsis thaliana*. Combinación de canales (D). Campo claro (E). Ampliación de la imagen anterior (F y G) donde se señalan las VAS (triángulos) y presumiblemente vesículas post-golgi (flechas). Microscopía confocal. Barras: 5 μ m.

Además de las vesículas de 1 μ m de diámetro se observaron vesículas más pequeñas de entre 0,3 y 0,5 μ m que sólo poseen señal de *Lysotracker red* y manosidasa I (Figs. 15, F y G). La señal de fluorescencia de YFP proveniente de estas vesículas más pequeñas es aproximadamente el doble de la detectada en las VAS y no poseen señal de clorofila.

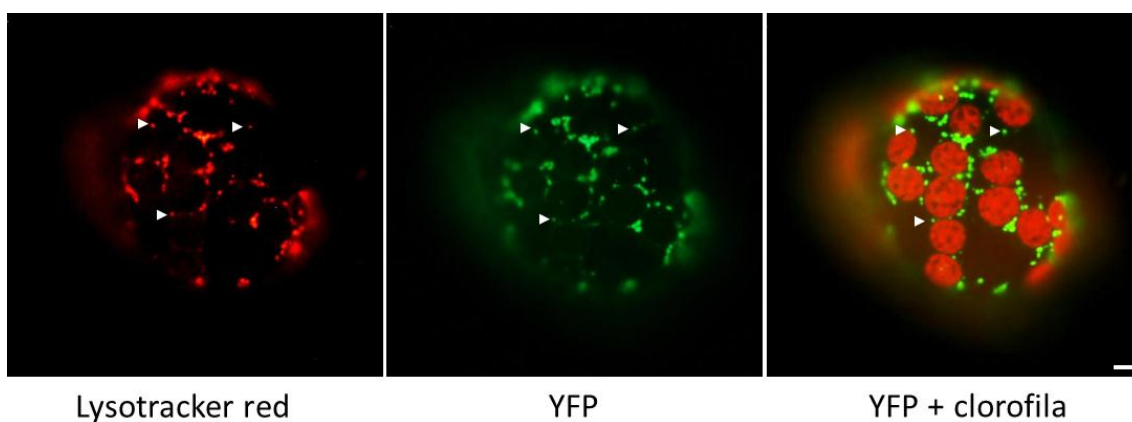


Figura 16: Detección de Manosidasa I en las VAS mediante microscopía de epifluorescencia. Colocalización de *Lysotracker Red* (rojo) y Manosidasa I:YFP (verde) en las VAS de hojas senescentes de *Arabidopsis thaliana*. Las flechas señalan a las VAS. Barra: 5 μ m

Estas observaciones sugieren que vesículas provenientes del aparato de Golgi, con la capacidad de acidificar su lumen y con Manosidasa I, aportarían componentes a las VAS.

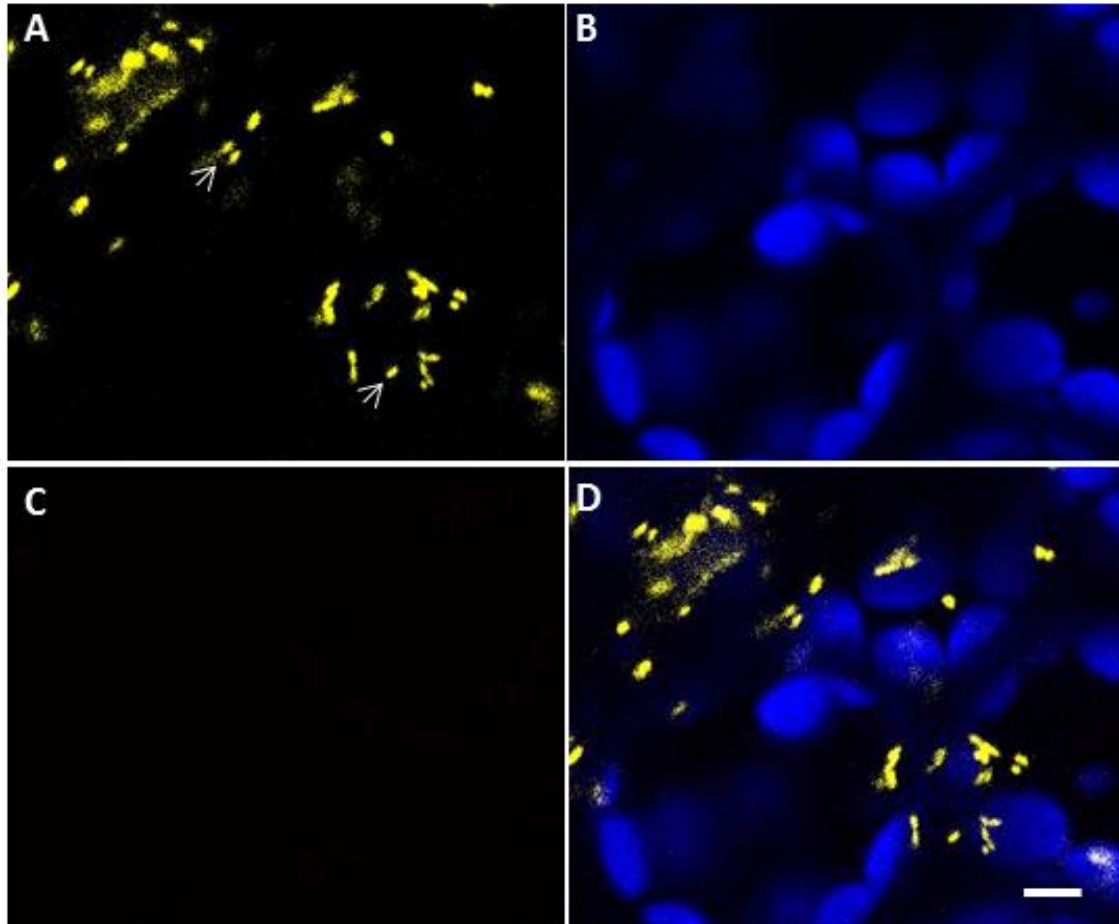


Figura 17: Detección de Manosidasa I en células no senescentes de *Arabidopsis thaliana*. Microfotografía confocal pseudocoloreada: ManI:YFP en amarillo (A), clorofila en azul (B), y Lysotracker Red en rojo (C). La imagen combinada de los tres canales se muestra en (D). Barras: 5 μ m.

-Discusión

Un pulso de VAS en el periodo de mayor actividad lítica.

Las VAS son abundantes en hojas de soja, *arabidopsis* y tabaco que “senescen” naturalmente unidas a la planta o cortadas e incubadas en oscuridad (Otegui *et al.*, 2005; Martínez & Costa *et al.*, 2008). Estas observaciones indican que las VAS son específicas de la senescencia o que al menos el mecanismo en el que están involucradas es significativamente más evidente en esta etapa del ciclo de vida de las plantas.

La marcación de proteasas por su actividad (mediante R6502) muestra que las VAS de *Arabidopsis thaliana* y soja tienen una intensa actividad proteolítica (Otegui *et al.*, 2005), aparentemente la mayor entre los compartimientos de la célula vegetal. Además, en las VAS de *Arabidopsis* se detectó SAG12, una proteasa cisteínica específica de la senescencia (Lohman *et al.*, 1994; Otegui *et al.*, 2005). A pesar de ser considerado un excelente marcador de la senescencia, SAG12 no es esencial para el desarrollo de ésta. Una mutación por inserción de T-DNA en SAG12 no modifica el curso de la senescencia ni la expresión de SAG13, otro marcador de senescencia (Otegui *et al.*, 2005).

En hojas de tabaco separadas de la planta, tratadas con etefón e incubadas en oscuridad, el incremento de la expresión de SAG12 tiene una ventana estrecha en el tiempo (2-4 días) que coincide con el pulso de aparición de las VAS (Figs. 1 y 6). El periodo de mayor degradación de clorofila, proteínas y caída del rendimiento cuántico potencial del fotosistema II, transcurre de manera sincronizada con el pulso de VAS durante la senescencia foliar (Figs. 4 y 5).

La expresión de NtCP1 (AY881011) durante la senescencia de tabaco (Fig. 6) muestra el mismo patrón que SAG12 (HQ108340). Según Beyene (2006) NtCP1 es una proteasa distinta de SAG12, sin embargo la similitud en secuencia es lo suficientemente importante como para sospechar de que estas dos secuencias podrían corresponder a la misma proteína.

Un estudio transcriptómico a gran escala realizado durante la senescencia natural de *Arabidopsis thaliana*, muestra un patrón de expresión de SAG12 similar al obtenido aquí (Breeze *et al.*, 2011). El perfil de expresión de SAG12 constituye un pulso asociado a los síntomas de la senescencia. Es interesante notar cómo el sistema de genes de autofagia también se corresponde con este perfil (Breeze *et al.*, 2011).

En la Figura 6C se muestra que la señal de SAG12:GFP pasa de estar presente en las VAS en el tercer día a ser detectado ocupando un espacio mayor en la célula, rodeando incluso a los cloroplastos. En algunos casos, este patrón de distribución fue también observado con la clorofila (no publicado). Este cambio en el patrón de localización de SAG12 puede tener dos explicaciones posibles: - que SAG12 y la clorofila sean descargadas en el citoplasma tardíamente en la senescencia; - que estos componentes de las VAS sean volcados en la Vacuola Central (este compartimiento ocupa la mayor parte del volumen celular). La segunda opción parece ser más coherente con el hecho de que la Vacuola Central tiene un papel clave en la degradación de biomoléculas durante la senescencia. Estas observaciones sugieren que el destino final de las VAS podría ser la Vacuola Central, pero para confirmar esta hipótesis se deberán realizar más estudios.

Resulta muy interesante el hecho de que las VAS tienen un periodo de aparición relativamente estrecho y que está correlacionado con el periodo de mayor degradación de los cloroplastos durante la senescencia. Si se divide a la senescencia foliar en dos grandes etapas consecutivas, la primera tendiente a la removilización de nutrientes (*v.g.*, aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas) con un carácter ordenado y altamente regulado, y una segunda etapa “terminal” de muerte de las células, inespecífico e irreversible, las VAS intervendrían en la primera etapa.

Sobre la base de lo expuesto, es posible pensar que las VAS participan de la fase pre-apoptótica de la senescencia (apoptosis *sensu* Reape & McCabe, 2008). Es decir, las VAS participarían del mecanismo de degradación que transcurre durante la primera fase de la senescencia. Dado que este es un proceso altamente regulado, se abre la posibilidad de que este mecanismo sea blanco de futuros desarrollos biotecnológicos, tendientes a la aceleración o retraso de la removilización de nutrientes desde las hojas hacia otros órganos.

La acidificación de las VAS.

Las VAS se definen esencialmente por ser vesículas pequeñas, ácidas, con intensa actividad proteolítica, y que contienen proteínas cloroplásticas. Para visualizar a las VAS mediante microscopia de fluorescencia, se utiliza *Lysotracker Red*, un marcador de compartimientos ácidos. La acidez de las VAS también es empleada para localizar la fracción subcelular enriquecida en VAS en un gradiente de sacarosa. Un tratamiento previo del extracto crudo de las hojas con el marcador de compartimientos ácidos, Rojo Neutro, permite visualizar la fracción 3 (F3) de coloración pardo-rojo (sección 2.1.4). Esta fracción se acidifica a lo largo de la senescencia en tabaco como muestra la Figura 8, teniendo un máximo entre las 48 y 54 h post-inducción evidenciado con luz UV, de color rojo brillante (el pico de emisión de fluorescencia del rojo neutro se sitúa alrededor de 600 nm), y con luz visible de color pardo. No es posible determinar con este experimento si el patrón es debido a un aumento en la abundancia de las VAS y/o a un incremento de la acidez en cada VAS.

Las VAS contienen una H^+ -Pirofosfatasa vacuolar (H^+ -V-PPasa) que fue inmunolocalizada mediante microscopía electrónica de transmisión (*immunogold labeling*, Otegui *et al.*, 2005) y detectada en las VAS aisladas por *Western-blot* (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Recientemente, en un análisis parcial del perfil proteómico de las VAS se detectaron distintas subunidades de la H^+ -V-ATPasa (Gómez *et al.*, en preparación). Posiblemente la presencia de estas bombas de protones en las VAS expliquen la acidez de estas vesículas. El perfil de expresión de la subunidad C de la H^+ -ATPasa vacuolar muestra el mismo patrón que SAG12, en coincidencia con el pulso de VAS durante la senescencia de tabaco (Fig. 7). Las ATPasas vacuolares no sólo se localizan en el tonoplasto, también han sido localizadas en vesículas del trans-Golgi, vesículas prevacuolares, endosomas, y autolisosomas (Herman, 1994; Dettmer *et al.*, 2006; Takatsuka *et al.*, 2011).

La aparición de las VAS está modulada hormonalmente.

Numerosos reportes indican que las fitohormonas modulan el progreso de la senescencia, e incluso en algunos casos pueden revertirla (Thomas *et al.*, 2003; Wingler & Roitsch, 2008). Una de la evidencias más robustas de esto es la aportada por Gan & Amasino (1995) al transformar tabaco con el gen de IPT (Isopentenil Transferasa, una enzima clave de la biosíntesis de citocininas) con el promotor de SAG12, específico de la senescencia. Estas plantas presentaban los síntomas de la senescencia retrasados y la expresión de genes asociados a la senescencia atenuada. Es posible que una disminución de la concentración de citocininas dispare la senescencia. Por ejemplo, el desarrollo de los granos de soja estaría provocando una disminución del flujo de citocininas a través el xilema y hacia las hojas, con la concomitante inducción de la senescencia de las mismas (Noodén *et al.*, 1990). El “desfrutado” de soja incrementa los niveles de citocininas y retrasa los síntomas de la senescencia (Noodén *et al.*, 1990). Las citocininas podrían estar regulando la transición de órganos *fuelle* a *destino* y viceversa a través de una cadena de señalización que involucra a la Inversa Extracelular (Cin1) asociada al metabolismo de carbohidratos (Balibrea *et al.*, 2004). Esta hipótesis también fue avalada por un estudio de la senescencia de plantas de tabaco donde expresan IPT bajo el promotor de SAG12 (Cowan *et al.*, 2005).

En la senescencia inducida por corte e incubación en oscuridad, las citocininas reprimen la expresión de la mayoría de los genes asociados a la senescencia en *arabidopsis* (Weaver *et al.*, 1998). Esta observación es coherente con los datos aquí obtenidos: las citocininas inhiben o al menos retrasan la aparición de las VAS durante la senescencia inducida por oscuridad (Fig. 9).

En la Figura 11 y 12, también se muestra el efecto del Etefón en el ritmo de la senescencia foliar. El etefón es un precursor químico que en ambiente levemente ácido, como el presente en el apoplasto, se transforma en Etileno. Como se mencionó en la introducción, el Etileno es la fitohormona que mayor efecto tiene en la aceleración de la senescencia. En la Figura 11 se muestra cómo la aplicación de etefón previo a la incubación en oscuridad, tiene como consecuencia la aceleración de la

degradación de clorofila, mientras que la abundancia de VAS se duplica. Anteriormente se había registrado un comportamiento similar al cuantificar las VAS presentes en secciones ópticas (confocales) de células en hojas tratadas y no tratadas con etefón (Martínez & Costa *et al.*, 2008).

El efecto inhibitorio de la Glutamina en la aparición de las VAS

Durante la senescencia, el nitrógeno que forma parte de las proteínas foliares es convertido en aminoácidos transportables, *i.e.*, glutamina y asparagina. Estos aminoácidos constituyen la vía más importante en el transporte de N a través del floema durante la removilización de N en la senescencia (Feller & Fischer, 1994). El N reciclado desde las hojas senescentes aporta entre 20 y 70% del N cosechado con las proteínas de los granos de trigo (Peoples & Dalling, 1988) y es fundamental para el crecimiento normal de los granos de maíz (Martin *et al.*, 2006). En *Nicotiana rustica* la senescencia inducida por oscuridad produce un aumento del contenido de glutamina y asparagina al mismo tiempo que se degradan las proteínas y aumenta la actividad de proteasas (Weckenmann & Martin, 1984).

Los resultados muestran que mantener un nivel alto de glutamina en el tejido foliar a través del suministro exógeno de glutamina, retrasa el progreso de la senescencia (Fig. 10). Resulta interesante que en el tratamiento con glutamina no aparecen VAS luego de 3 días en oscuridad, sin embargo en el control realizado sin glutamina, la aparición de VAS es normal (Fig. 11). El contenido medio de glutamina en hojas maduras de tabaco es de 2 mmol/g de peso fresco (Migge *et al.*, 2000) y la concentración utilizada en este experimento es aproximadamente un orden de magnitud mayor, lo cual supone que la glutamina estuvo en exceso durante el tratamiento. Este resultado sugiere que la glutamina reprime el mecanismo por el cual las VAS se desarrollan.

El efecto regulatorio de la glutamina en el desarrollo de las VAS podría tener relación con el balance de N entre órganos fuente/destinos. Durante el desarrollo de estructuras reproductivas, esencialmente heterotróficas, el balance de N en la planta se ve afectado. En especies monocárpicas, donde este fenómeno es muy importante,

una disminución en el contenido de glutamina podría inducir el proceso de removilización de N hacia los órganos en desarrollo. Esta hipótesis explicaría, al menos parcialmente, los resultados expuestos anteriormente (Figs. 10 y 11).

La glutamina tiene un efecto importante en la regulación de TORC1, un complejo que mantiene reprimido el mecanismo de autofagia en levaduras, sugiriendo que este aminoácido es un indicador del estado nutricional de la célula (Crespo *et al.*, 2002). En condiciones normales, el complejo TOR (del inglés, *Target of Rapamycin*) está reprimiendo el mecanismo de la autofagia a través de URE2. Pero cuando el balance nutricional se ve afectado, una disminución del pool de glutamina evitaría que TOR reprimiera a URE2 y entonces este a su vez activaría al factor de transcripción GLN3, implicado en la expresión de genes de autofagia (Cárdenas *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001). A pesar de que este mecanismo fue estudiado en levaduras y células animales, también se sugiere una vía de regulación similar en plantas dado el alto nivel de conservación de este proceso (Díaz-Troya *et al.*, 2008). Estos antecedentes indican que los niveles de glutamina podrían ser parte del mecanismo de censado del estado nutricional de las células.

Un marcador del Aparato Golgi en las VAS.

La colocalización de clorofila, *Lysotracker Red* y el dominio trans-membrana de la α -1,2-manosidasa I fusionada a YFP en vesículas de aproximadamente 1 μ m, sugiere fuertemente que en la biogénesis de las VAS podría estar involucrado el Aparato de Golgi. Esta observación puede complementarse con la caracterización bioquímica de las VAS realizada en Martínez & Costa *et al.* (2008) donde se mostró que la fracción enriquecida en VAS posee actividad manosidasa, aunque menor que el extracto crudo de la hoja.

La α -manosidasa I fue localizada en la fracción cis-Golgi empleando una fusión con GFP en células BY-2 de *Nicotiana tabacum* (Nebenfuhr *et al.*, 1999). Las estructuras detectadas mostraban fluorescencia en forma de anillo o bastones de aproximadamente 1 μ m de longitud. Este patrón de fluorescencia se corresponde con el detectado en este trabajo en hojas no senescentes (Fig. 13).

En base a estos datos, es viable pensar que el aporte de H^+ -ATPasas y Pirofosfatasa a las VAS provenga del aparato de Golgi. Se ha detectado la presencia de estas bombas de protones en el Golgi y la aplicación de Concanamicina A y Bafilomicina A, inhibidores de estas bombas, impiden la formación normal de vesículas post-golgi (Robinson *et al.*, 2004; Viotti *et al.*, 2010) y afectan el mecanismo de la autofagia (Takatsuka *et al.*, 2011). Existe evidencia que relaciona el origen de estructuras implicadas en procesos líticos, *i.e.* autofagosomas y la vía Cvt (del inglés, *Cytoplasm to vacuoles targeting*), con el complejo de Golgi en *Saccharomyces cerevisiae* (Hamasaki *et al.*, 2003; Reggiori *et al.*, 2004; van der Vaart *et al.*, 2010).

En las Figuras 12, F y G se mostró la presencia de intensa señal de ManI:YFP y *Lysotracker Red* en vesículas de entre 0,3 y 0,5 μm de diámetro que a diferencia de las VAS no poseen señal de clorofila. Es poco probable que las “vesículas pequeñas” puedan ser atribuidas al Golgi dado que este posee un tamaño aproximado de 1 μm (Madison & Nebenfuhr, 2011). Entonces, sería posible pensar en “vesículas post-golgi” portadoras de H^+ -ATPasas y PPasas que acidifican su lumen, evidenciado por el *Lysotracker Red* y α -manosidasa I como marcador de Golgi. En *Chlamydomonas reinhardtii* se describieron pequeñas vesículas de doble membrana con componentes del estroma cloroplástico en el citoplasma que interactúan con vesículas post-golgi antes de dirigirse a la Vacuola (Park *et al.*, 1999). Los autores proponen un mecanismo de degradación extraplastidial de proteínas estromáticas donde participan vesículas post-golgi y la vacuola central.

Es interesante destacar que la intensidad de señal de ManI:YFP que presentan las vesículas pequeñas es aproximadamente el doble que las VAS. Este patrón se repite en todas las vesículas dependiendo de su tamaño y podría ser explicado si se postula que las VAS son el producto de la fusión de vesículas originadas en el cloroplasto con vesículas post-golgi. La fusión de las vesículas pequeñas, presumiblemente post-golgi, con otras vesículas podría diluir la concentración de ManI:YFP y, por lo tanto, atenuar la señal de YFP en las VAS.

Actividad Proteolítica de las Vacuolas Asociadas a la Senescencia.

- Introducción

La senescencia foliar es la etapa del desarrollo de las hojas que precede a su muerte. Se trata de un proceso controlado de dismantelamiento durante el cual casi todas las organelas son degradadas y una parte sustancial de los productos de degradación (*v.g.*, aminoácidos) son exportados a otras partes de la planta (Feller, 2004; Mae, 2004; Gregersen *et al.*, 2008; Guiboileau *et al.*, 2010). Los cloroplastos son los orgánulos más afectados, probablemente porque representan la mayor fuente de nitrógeno removilizable de la hoja y su degradación causa la caída del potencial fotosintético (Gepstein, 1988; Krupinska, 2007). Es por este hecho, que poder lograr la comprensión del mecanismo y regulación de la degradación de los cloroplastos durante la senescencia es crucialmente importante en cualquier intento de prolongar la etapa fotosintéticamente activa de los cultivos y/o mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno.

La degradación de los cloroplastos es temprana en relación al deterioro de otras organelas. Por ejemplo, se ha demostrado que las mitocondrias y la membrana plasmática se mantienen intactas en etapas avanzadas de la senescencia, cuando el dismantelamiento de los cloroplastos ya ha progresado sustancialmente (Noodén, 1988). Frecuentemente, la degradación de las proteínas del estroma del cloroplasto (*v.g.*, Rubisco) precede a la pérdida de clorofila y de proteínas de las membranas tilacoidales (Krupinska, 2007). Sin embargo, la plasticidad y por ende los tiempos relativos de degradación de los componentes del cloroplasto pueden depender de las especies, de las condiciones ambientales, y de otros factores que inducen o retrasan la senescencia (Hidema *et al.*, 1991; 1992). Entonces resultaría difícil describir una única secuencia temporal de degradación de los distintos componentes fotosintéticos.

Hasta el presente, poco se conoce sobre el mecanismo proteolítico y las proteasas involucradas en la degradación de las proteínas cloroplásticas, incluyendo la proteína foliar más abundante, Rubisco. La degradación de los componentes de los cloroplastos podrían ser llevada a cabo por proteasas ubicadas dentro de la misma organela (Zhang *et al.*, 2005; Sakamoto, 2006; Feller *et al.*, 2008). Varias proteasas con señal de direccionamiento al cloroplasto aumentan su expresión durante la senescencia de las hojas (Bhalerao *et al.*, 2003; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003;

Andersson *et al.*, 2004; Gou *et al.*, 2004; Gregersen & Holm, 2007). Algunos miembros de las familias de proteasas serínicas DegP y FtsH han sido implicadas en la degradación de la proteína D1 y de otras proteínas del fotosistema II durante la fase de reparación en la fotoinhibición (Zaltsman *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010). La proteasa aspártica CND-41, que tiene un sitio de unión a DNA, degrada Rubisco *in vitro* y en líneas anti-sentido también se retrasa la degradación de Rubisco, lo cual sugiere que podría tener una participación importante en el desmantelamiento de los cloroplastos. Sin embargo, estas líneas anti-sentido poseen un fenotipo enano y bajos niveles de giberelinas (Nakano *et al.*, 2003), de manera que es imposible descartar que el retraso de la senescencia no sea debido a efectos correlativos (i.e., influencias inter-orgánicas), sin una participación directa de CND41 en la degradación de Rubisco. Hasta ahora, no hay claras evidencias que relacionen a las proteasas cloroplásticas con la degradación de las proteínas estromáticas del cloroplasto.

A través de estudios de transcriptómica y de expresión génica (Hensel *et al.*, 1993; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Gregersen & Holm, 2007; Parrott *et al.*, 2010) se ha demostrado que la expresión de proteasas cisteínicas invariablemente aumenta durante la senescencia, por lo que las proteasas cisteínicas podrían jugar un papel muy importante en la degradación de proteínas asociadas a la senescencia. La actividad de las proteasas cisteínicas generalmente se incrementa durante la senescencia foliar y de pétalos (Wagstaff *et al.*, 2002; van der Hoorn *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2007). Además, un trabajo en trigo muestra que la inhibición de proteasas cisteínicas *in vivo* disminuye la degradación de proteínas en discos de hojas senescentes (Thoenen *et al.*, 2007).

Evidencias recientes sugieren que Rubisco, y otras proteínas estromáticas podrían ser degradadas fuera de los cloroplastos. En hojas senescentes de trigo y *Arabidopsis* se hallaron en el citoplasma y en la vacuola central pequeñas vesículas que contienen Rubisco (RCB, del inglés: “*Rubisco Containing Bodies*”, Chiba *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2008). A diferencia de las VAS, las RCB no fueron reportadas como compartimientos ácidos ni con actividad proteolítica.

En las VAS se ha detectado la presencia de Rubisco, Glutamina Sintetasa 2 (cloroplástica), PsaA y clorofila (Otegui *et al.*, 2005; Martínez & Costa *et al.*, 2008;

Gómez *et al.*, en preparación) y pueden degradar estos componentes en sistemas *in vitro*. El empleo de un sustrato fluorescente de proteasas cisteínicas evidenció que la actividad proteolítica en las hojas senescentes se concentra en las VAS (Otegui *et al.*, 2005). Además, la degradación *in vitro* de Rubisco en las VAS fue completamente inhibido con un coctel de inhibidores de proteasas (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Estas evidencias le dan a las VAS no sólo un posible papel en la exportación de componentes fotosintéticos fuera del cloroplasto durante la senescencia, sino también, en la degradación de estos.

Las proteasas cisteínicas y las VAS podrían tener un papel muy importante en la degradación de proteínas durante la senescencia foliar. En este capítulo se presentan evidencias que muestran la participación de proteasas cisteínicas de las “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” en la degradación de componentes del estroma del cloroplasto.

-RESULTADOS

4.1 - Las proteasas cisteínicas son las principales proteasas en las VAS.

Observaciones mediante microscopía confocal mostraron que la máxima abundancia de las VAS coincide con el periodo de mayor degradación de proteínas (alrededor de los 3 días de incubación) en hojas tratadas con etefón y mantenidas en oscuridad. Se ha sugerido que las VAS tendrían actividad de proteasas cisteínicas al detectar señal de una sonda fluorescente (R6502) que es sustrato relativamente específico para estas proteasas (Otegui *et al.*, 2005) y hay evidencias de que las VAS participan en la degradación de Rubisco (Martínez & Costa *et al.*, 2008).

Para analizar que tipo de proteasas está involucrada en la degradación de Rubisco dentro de las VAS se realizó un ensayo de autodigestión *in vitro*. Se empleó una fracción de VAS tratada con termolisina para evitar que proteasas externas a las VAS interfirieran con los resultados del experimento de autodigestión y se siguió en el tiempo la disminución de los niveles de Rubisco contenida en las VAS. La fracción de VAS fue dividida en 4 alícuotas, las que fueron incubadas durante 4 h a 37°C según el siguiente esquema: 1) sin inhibidores de proteasas (control), 2) con un cóctel de

inhibidores de proteasas, 3) con AEBSF, inhibidor de proteasas serínicas, y 4) con E-64, un inhibidor específico de proteasas cisteínicas, respectivamente. Luego de la autodigestión en las VAS, se realizó un western-blot para detectar la degradación de Rubisco. Se observó que una fracción importante de la subunidad grande de Rubisco (LSU) fue degradada luego de 4 h de autodigestión en el tratamiento control (sin inhibidores) y en el tratamiento con AEBSF. De acuerdo con datos anteriores (Martínez & Costa *et al.*, 2008) el cóctel de inhibidores de proteasas evitó la degradación de LSU. El tratamiento con el inhibidor específico de proteasas cisteínicas (E-64) también impidió la degradación de LSU, sugiriendo que es este tipo de proteasas las que participan en la degradación de Rubisco en las VAS (Fig. 2)

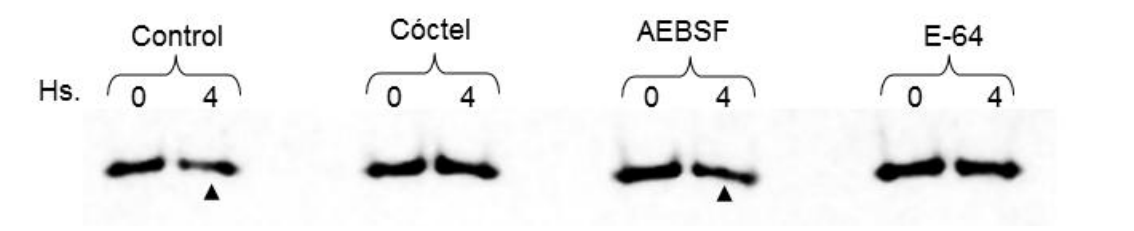


Figura 1: Inhibición de la digestión *in vitro* de LSU en las VAS. La banda de proteína correspondiente a LSU muestra una disminución a las 4 h de autodigestión (cabezas de flechas). El agregado de un cóctel de inhibidores de proteasas o de un inhibidor de proteasas cisteínicas (E-64) impide la degradación de LSU.

4.2 - Detección y purificación de proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia en las VAS.

Para detectar las proteasas cisteínicas presentes en las VAS se empleó una modificación de la técnica de Greembaum *et al.* (2000) de marcación basada en la actividad. Este método emplea DCG-04, un derivado biotinilado del inhibidor de proteasas cisteínicas E-64 que al unirse irreversiblemente con el sitio activo de la proteasas agrega una marca de biotina a la misma. Esto permite detectar las proteasas cisteínicas mediante la técnica de *Western-blot*, revelando con estreptavidina-peroxidasa, o su purificación, a través de estreptavidina unida a una matriz sólida ("beads" magnéticas). Como control de especificidad, por cada muestra marcada con DCG-04, una alícuota fue pre-incubada con E-64, de tal manera que en esta muestra el DCG-04 no encuentre sitios activos de proteasas cisteínicas libres a las cuales unirse.

Solamente las bandas detectadas con DCG-04 en el *western blot* y que además son inhibidas por el pre-tratamiento con E-64 corresponden a proteasas cisteínicas.

Mediante esta técnica se pudieron detectar tres bandas específicas de proteasas cisteínicas en el extracto crudo de hojas senescentes de tabaco y dos bandas en la fracción enriquecida en VAS (F3). Las bandas correspondientes a proteínas de 40, 33 kDa están presentes en ambas muestras, mientras que la banda de 21 kDa está ausente en las VAS (Fig. 2). La presencia de la misma marca específica en las VAS y en el extracto crudo de hojas de tabaco, sugiere que las VAS constituyen un subconjunto de la célula enriquecido en proteasas cisteínicas.

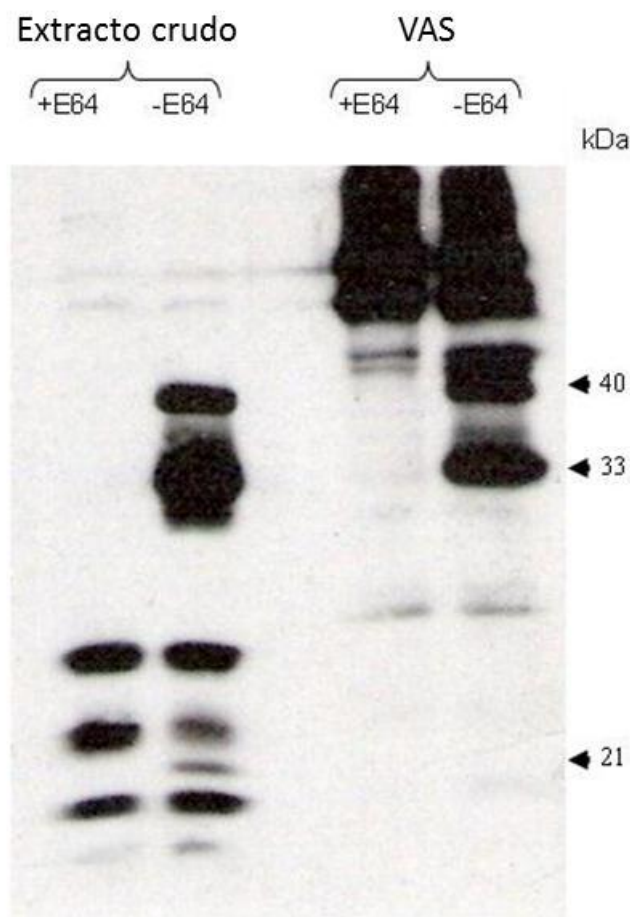


Figura 2: Detección de proteasas cisteínicas en el extracto crudo y en las VAS de tabaco. Las bandas que están presentes también en las alícuotas pre-tratadas con E-64 son inespecíficas y no pueden ser consideradas proteasas cisteínicas. Con flechas se indican los pesos moleculares de las proteasas cisteínicas. Las muestras fueron sembradas por volumen derivado directamente de las fracciones obtenidas del aislamiento de las VAS en el gradiente de Sacarosa.

Se comparó el patrón de proteasas cisteínicas de las VAS, los cloroplastos y el extracto crudo de la misma hoja senescente. Se detectaron 2 bandas atribuibles a proteasas cisteínicas de 40 y 33 kDa en las VAS pero mediante este método no se pudieron detectar proteasas cisteínicas ni en los cloroplastos ni en el extracto crudo de

hoja cuando se normaliza la cantidad de muestra por μg de proteína (Fig. 3). Es decir, por cantidad de proteína, las VAS están fuertemente enriquecidas en proteasas cisteínicas.

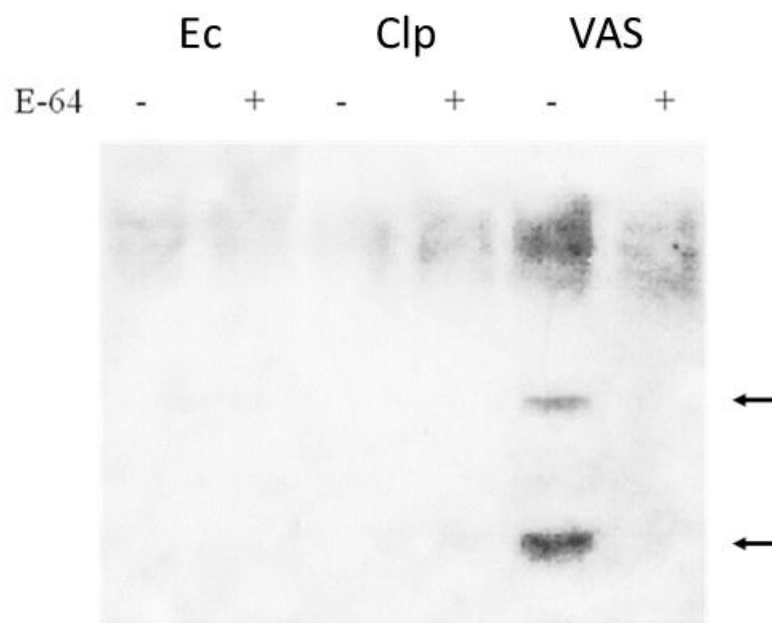


Figura 3: Purificación de proteasas cisteínicas del extracto crudo, cloroplastos y VAS de tabaco. Las bandas que están presentes tanto en las alícuotas pre-tratadas con E-64 como sin tratar, son inespecíficas y no pueden ser consideradas proteasas cisteínicas. Se sembraron iguales cantidades de proteína (30 μg) por calle. Con flechas se indican las proteasas cisteínicas de 33 y 40 kDa. Ec: extracto crudo; Clp: cloroplastos; VAS: vacuolas asociadas a la senescencia.

En un trabajo realizado en paralelo a esta tesis, y con una metodología similar se purificaron las proteasas cisteínicas del extracto crudo hoja número 1 de Cebada inducida a “senescer” con incubación en oscuridad durante 3 días. El patrón de proteasas observado fue similar al hallado en las VAS de hojas de Tabaco. Se detectaron dos bandas específicas de 30 y 40 kDa aproximadamente (Fig. 4). En colaboración con el laboratorio de la Dra. Karin Krupinska (“Biologie der Pflanzenzelle” Universidad de Kiel, Alemania) se identificaron las proteasas presentes en los extractos crudos de hojas de cebada senescentes mediante Espectrometría de Masas. En la banda superior (Fig. 4B) se encontró pap-13 (SAG-12, CAQ00108) y en la inferior las proteasas: pap-6 (CAQ00105), pap-14 (CAQ00109) y otra proteasa cisteína del tipo de aleuraína (CAA28804)(Hollmann, no publicado).

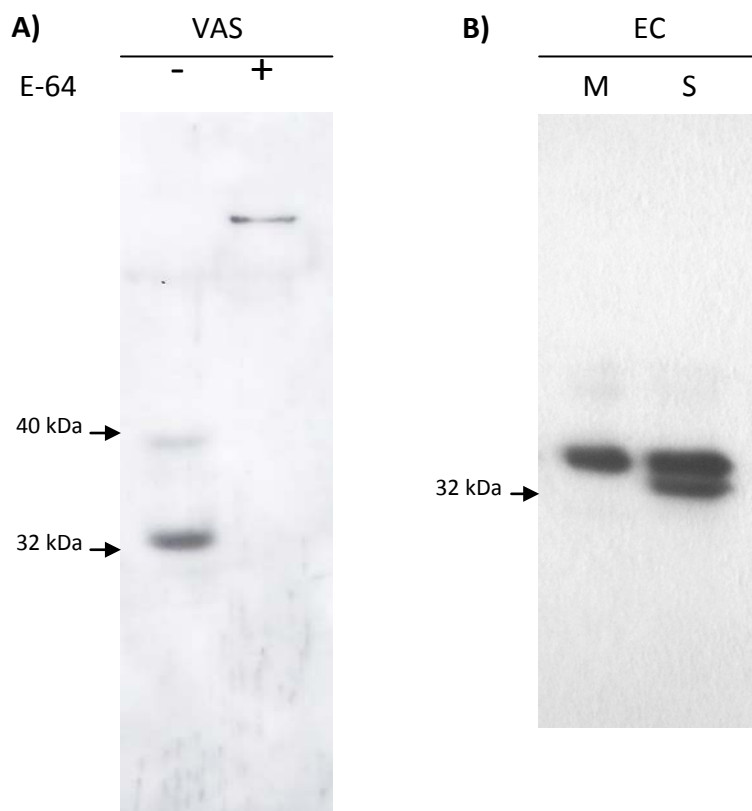


Figura 4: Detección de proteasas cisteínicas en Cebada mediante *Western blot*. En las VAS de Cebada se detectaron dos bandas de proteasas cisteínicas con los mismos pesos moleculares que en tabaco (A). En el extracto crudo de cebada, se detectaron dos proteasas cisteínicas de las cuales la de 32 kDa es específica de hojas senescentes (B). Hojas maduras (M) y senescentes (S).

4.3 - La inhibición *in vivo* de proteasas cisteínicas reduce la degradación de proteínas cloroplásticas.

Para analizar el papel de las proteasas cisteínicas en la degradación de proteínas cloroplásticas durante la senescencia, se diseñó un experimento de inhibición *in vivo*. Se utilizaron discos de hojas tratadas con etefón e incubadas entre 2 y 4 días en oscuridad en presencia del inhibidor E-64. Se analizó el contenido de proteínas mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE. A los cuatro días de tratamiento, se observó una evidente inhibición de la degradación de la subunidad

grande y pequeña de Rubisco en los discos tratados con E-64, en comparación con el control (Fig. 5).

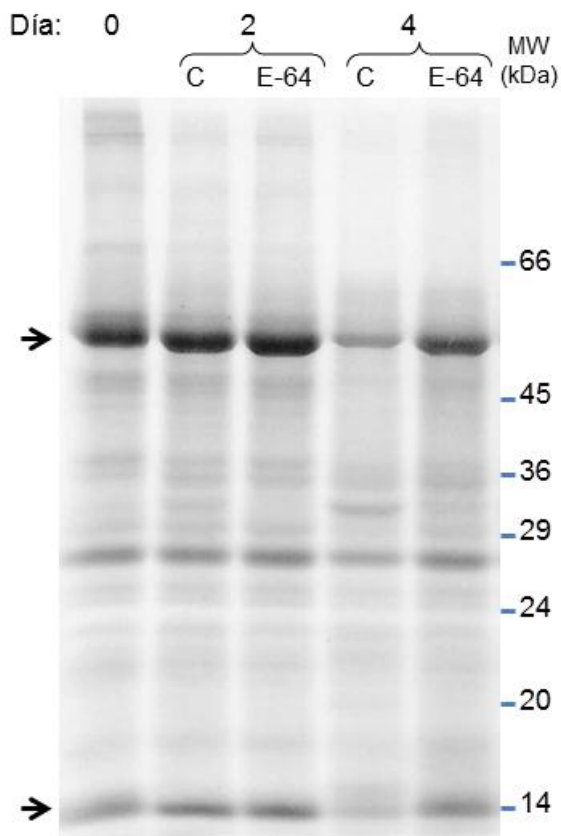


Figura 5: Efecto de la Inhibición *in vivo* de proteasas cisteínicas en discos de hojas de tabaco. A los 2 y 4 días de incubación, los discos tratados con E-64 retienen mayores niveles de Rubisco en comparación con los controles no tratados con inhibidor. Las flechas indican las subunidades grande y pequeña de Rubisco. Las muestras fueron sembradas por unidad de superficie foliar.

Mediante microscopía confocal se confirmó que la mayor parte de la actividad de proteasas cisteínicas, evidenciada por la sonda R6502, co-localizó con clorofila y *Lysotracker Red* dentro de las VAS en las células de hojas senescentes de tabaco. La inducción de la senescencia consistió en la incubación de hojas de tabaco en oscuridad durante 48 h pero en este caso sin el tratamiento de Etefón para facilitar la detección de clorofila en las VAS (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Se observaron numerosas VAS marcadas con *Lysotracker Red* (Fig. 6A) rodeando los cloroplastos. Aproximadamente la mitad de las VAS presentaron actividad de proteasas cisteínicas (Fig. 6B) y sólo algunas presentaron niveles de clorofila detectables (Fig. 6C).

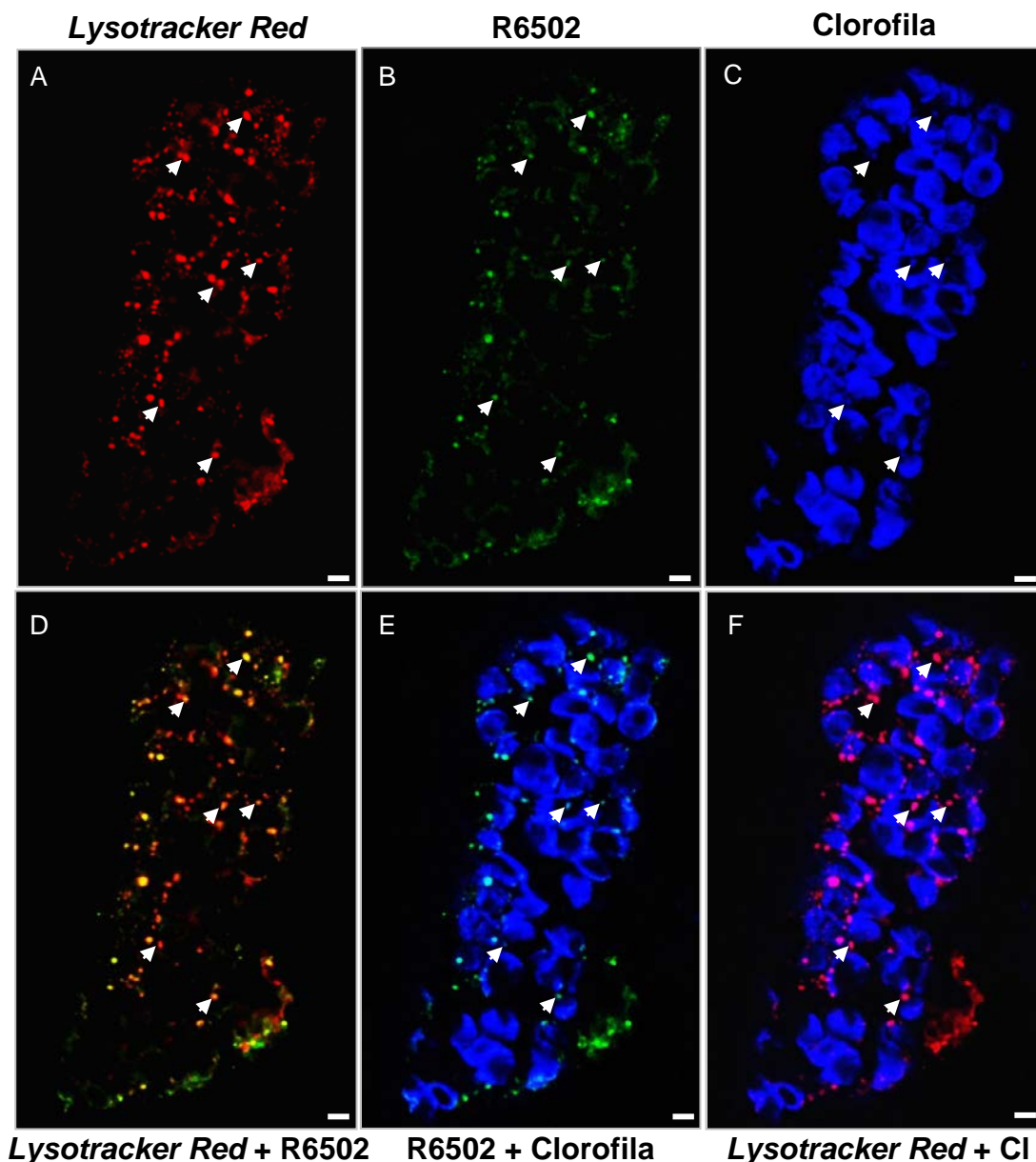


Figura 6: Co-localización de clorofila, *LysoTracker Red* y actividad de proteasas cisteínicas (R6502) en VAS de tabaco senescente. Las imágenes están pseudo-coloreadas. En color naranja la co-localización de *LysoTracker Red* y R6502 (D); en color celeste la co-localización de R6502 y clorofila (E) y en magenta la co-localización de *LysoTracker Red* y clorofila (F). Las flechas señalan ejemplos de VAS donde co-localizan *LysoTracker Red*, R6502 y clorofila. Microscopía Confocal. Barra: 5 μ m

Para verificar la localización de la inhibición de la actividad proteolítica *in vivo* por E-64, se aislaron células de hojas senescentes inducidas con etefón e incubadas 2 días en oscuridad. Las células aisladas se trataron con E-64 durante 2 horas previo a la incubación con el sustrato fluorescente R6502. Las células control (sin tratamiento con

E-64) observadas mediante microscopía confocal mostraron que las VAS poseen actividad proteolítica, como había sido descrito previamente (Otegui *et al.*, 2005; Martínez & Costa *et al.*, 2008; y Fig. 6). En cambio, en las células pretratadas con E-64, las VAS no mostraron actividad proteolítica detectable con la sonda R6502 (Fig. 7). Estos resultados indican que el inhibidor de proteasas cisteínicas, E-64, puede entrar en las VAS e inhibir la mayor parte de la actividad lítica de estas vesículas *in vivo*, causando la inhibición de la degradación de las proteínas estromáticas.

La señal de *Lysotracker Red* posee un patrón similar en las células sin tratar y pretratadas con E-64, lo cual permite suponer que las VAS están presentes en ambos tratamientos. Por otro lado, la actividad de las proteasas cisteínicas está inhibida al no detectarse señal de R6502 en las VAS de células pretratadas con E-64. Esta evidencia reforzaría la idea de que las VAS son los compartimientos con mayor actividad de proteasas cisteínicas en la célula. Como se mostró en las Figuras 1 y 4, las proteasas cisteínicas son la responsables, al menos de la mayor parte de la degradación de Rubisco, por lo tanto resulta bastante probable que la degradación de Rubisco ocurra mayoritariamente en las VAS.

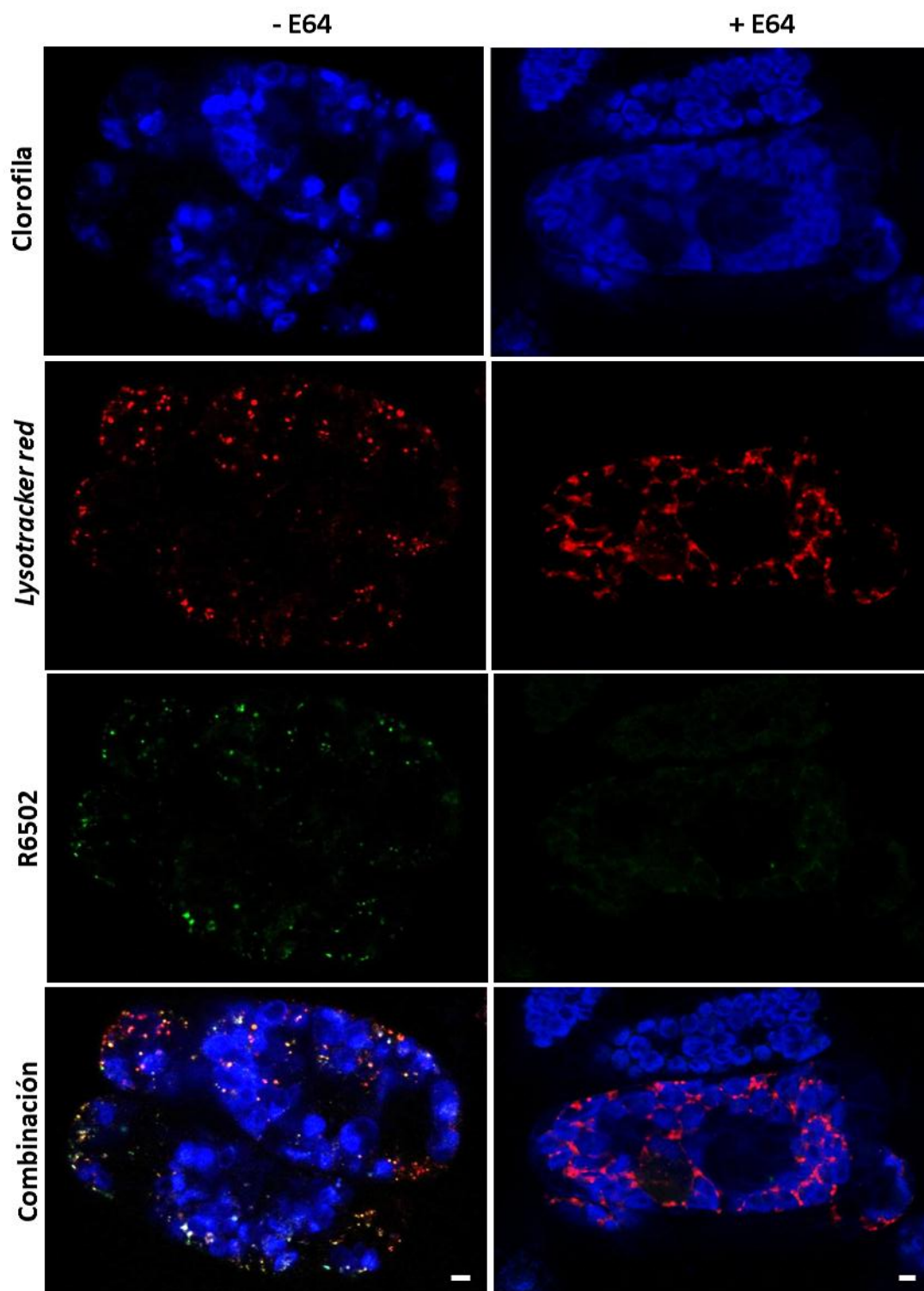


Figura 7: Inhibición de la actividad de proteasas cisteínicas en las VAS *in vivo*. Células de tabaco senescentes, tratadas y no tratadas con E-64. En las hojas tratadas con E-64, no se observa señal específica de R6502. Microfotografías confocales pseudocoloreadas: en azul la clorofila, en rojo el *LysoTracker Red*, en verde el R6502. Barra: 5 μ m.

4.4 – La inhibición de H⁺-ATPasa inhibe la acidificación y la actividad proteolítica en las VAS.

Generalmente las proteasas cisteínicas son activas a pH bajos (v.g., Martínez *et al.*, 2007) como el que se presenta en las VAS (Otegui *et al.*, 2005). Varios análisis proteómicos de la composición de las VAS han indicado que contienen diversas subunidades de la H⁺-ATPasa vacuolar (V-H⁺-ATPasa, Gómez *et al.*, en preparación), lo que sugiere que esta proteína sería responsable, al menos parcialmente, de la acidificación de las VAS. Tanto la marcación con *Lysotracker Red*, que se acumula en compartimientos ácidos, como con R6502 que es un sustrato fluorescente de proteasas cisteínicas, dependerían directa o indirectamente de la acidificación de las VAS.

Para evaluar la participación de la V-H⁺-ATPasa en la acidificación de las VAS se empleó concanamicina A, un inhibidor específico de las H⁺-ATPasas vacuolares. Este inhibidor ha sido empleado frecuentemente para estudios similares en plantas con el objetivo de neutralizar compartimientos ácidos (v.g., Wada *et al.*, 2009; Yoshimoto, 2012). Sin embargo, cabe notar que, además de su posible efecto sobre el pH luminal de las VAS, la concanamicina A además podría tener un efecto desorganizador del Aparato de Golgi (Woo *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 2004; Dettmer *et al.*, 2006).

De hojas de tabaco incubadas en oscuridad durante 24 h se obtuvieron discos que fueron tratados con Concanamicina A por 20 h, como en Ishida *et al.* (2008). Luego, de los discos se aislaron células que fueron marcadas con *Lysotracker Red* y R6502 antes de realizar las observaciones al microscopio confocal. Además, se extrajeron las proteínas a partir de discos tratados con y sin Concanamicina A para comparar el patrón de degradación en el extracto crudo, a las 48 h de inducida la senescencia. En la Figura 8 se muestra un gel SDS-PAGE de muestras tomadas a las 24 y 48 h de iniciada la incubación en oscuridad. La degradación de la subunidad grande de Rubisco fue aproximadamente un 20% mayor en los discos controles que en los tratados con Concanamicina A, en 24 h de incubación. Además, la inmunodetección de LSU, reveló que en los discos tratados se retuvo un fragmento de Rubisco de 50 kDa, es decir, un

péptido de aproximadamente 3 kDa fue clivado de la LSU pero la degradación se detuvo en ese punto, como efecto de la Concanamicina A.

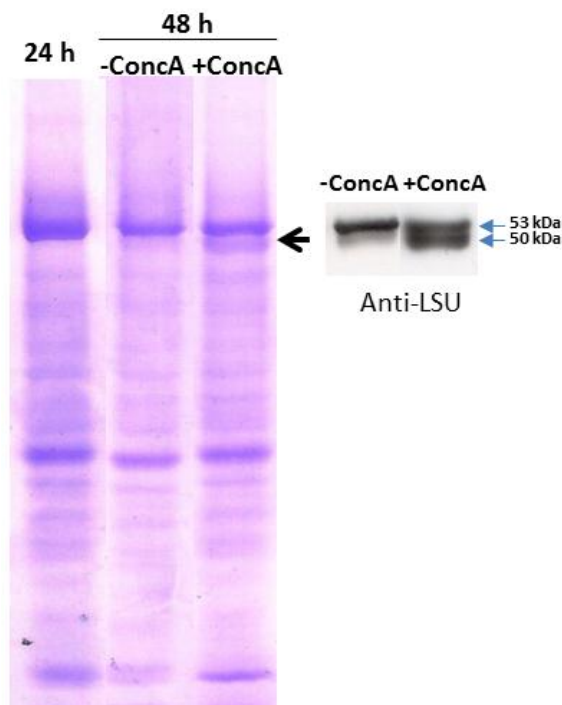


Figura 8: Inhibición *in vivo* de la degradación de proteínas mediante Concanamicina A. SDS-PAGE de las proteínas del extracto crudo de discos de hojas de tabaco senescentes tratados con Concanamicina A durante 20 h (Izquierda). Inmunodetección de LSU donde se observa la retención de un fragmento de Rubisco de 50 kDa en los discos de tabaco tratados con Concanamicina A (Derecha). El SDS-PAGE y el blot fueron sembrados con cantidades de extracto equivalentes a la misma área foliar. Tanto los discos del tratamiento como del control fueron tomados de la misma hoja.

En la Figura 9 se muestran células tratadas con el inhibidor de V-H⁺-ATPasas. En el control, se detectan claramente las VAS mediante las señales colocalizadas de R6502 (actividad de proteasas cisteínicas) y *Lysotracker Red*. En cambio, el tratamiento con Concanamicina A, reduce la acidez (*Lysotracker Red*) y la actividad de proteasas cisteínicas de las VAS.

Entonces, la actividad lítica de las VAS puede bloquearse mediante la inhibición de sus proteasas cisteínicas con E-64 o reduciendo la acidificación de las VAS al inhibir la V-H⁺-ATPasa con Concanamicina A. Este resultado refuerza la idea de que la actividad de las proteasas cisteínicas de las VAS depende de la acidez del medio, y

sugiere fuertemente que las proteasas cisteínicas de las VAS tienen un rol importante en la degradación de las proteínas fotosintéticas del cloroplasto.

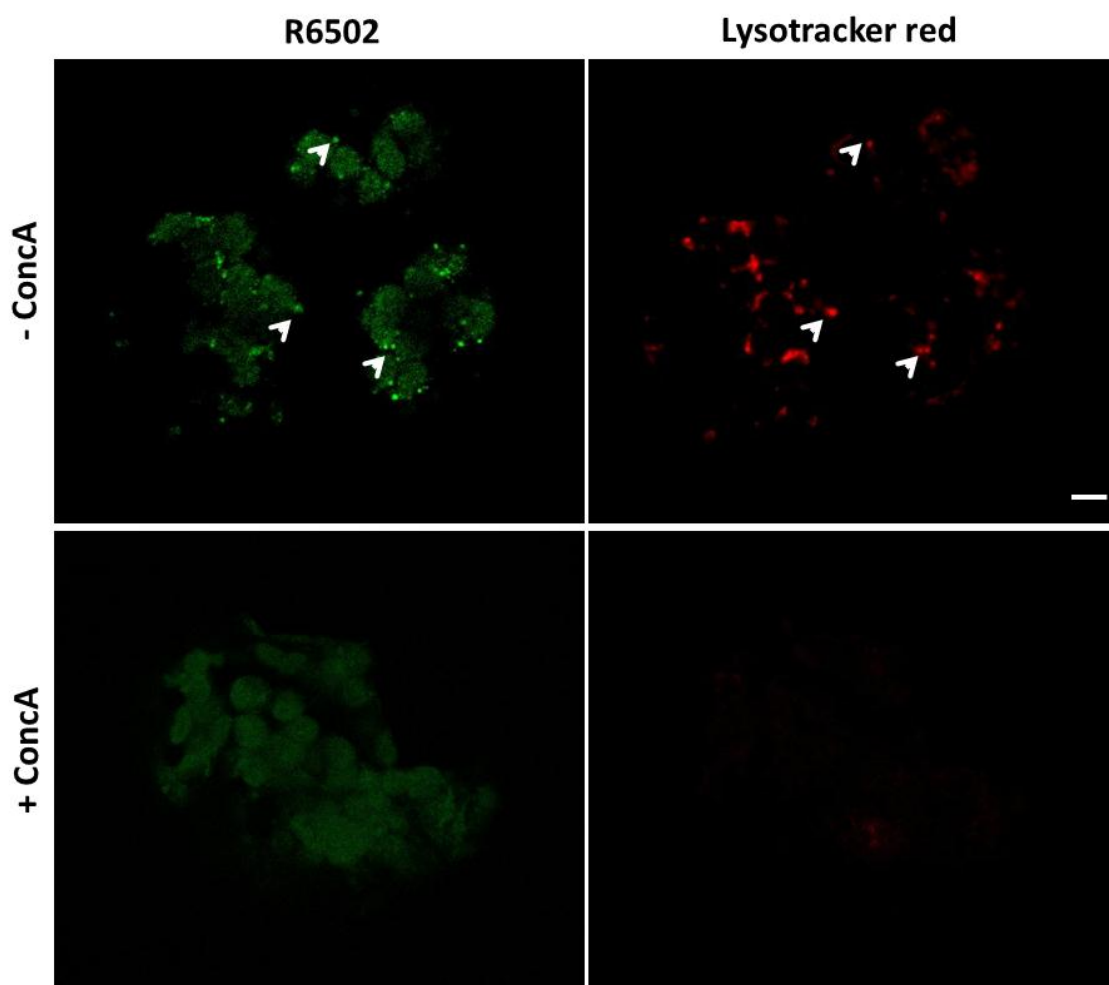


Figura 9: Efecto de la Concanamicina A en la acidificación y actividad proteolítica de las VAS. Células de tabaco senescentes. Microfotografía confocal pseudocoloreada: con verde para R6502 y con rojo para *Lysotracker Red*. Las flechas señalan VAS donde co-localizan *Lysotracker Red* y R6502. Barra: 5 µm

4.5 - La proteasa cisteínica SAG12 esta presente en las VAS de tabaco.

Uno de los marcadores moleculares más empleados para monitorear el progreso de la senescencia es la proteasa cisteínica SAG12. No se conoce la función específica de esta proteasa, aunque su expresión está restringida a la fase de senescencia de las hojas.

Se transformaron plantas de tabaco con la misma construcción de SAG12:GFP utilizada para detectar SAG12 en las VAS de *arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005; Carrión *et al.*, en preparación). Luego de la inducción de la senescencia en hojas cortadas e incubadas durante 96 h en oscuridad, se observó señal de GFP en las VAS de células del mesófilo colocalizando con *Lysotracker Red* (Fig. 10). En algunas células también se observó señal de SAG12-GFP en los cloroplastos.

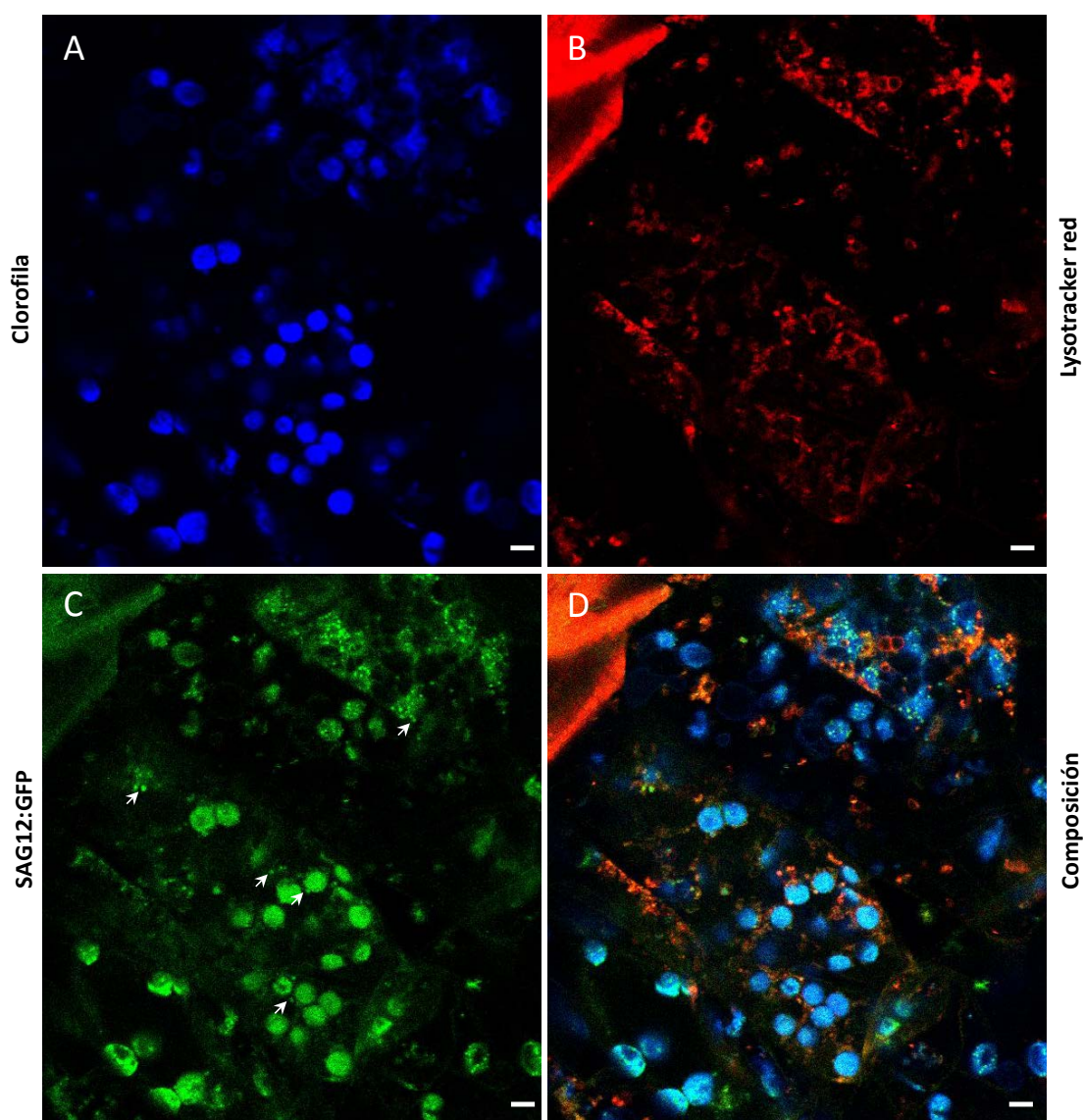


Figura 10: Detección de SAG12 en las VAS de tabaco. Imágenes de microscopía confocal de células del mesófilo donde se detecta clorofila (A), *Lysotracker Red* (B) y SAG12:GFP (C). En la composición de canales se observa la colocalización de SAG12 y *Lysotracker Red* (D). Barra: 5 μ m.

4.6 - Presencia de PsaA en las VAS.

Además de degradar Rubisco, las VAS pueden degradar la proteína PsaA *in vitro*, principalmente mediante la actividad de proteasas cisteínicas (Gómez *et al.*, en preparación). PsaA forma parte del centro de reacción del Fotosistema I y junto con las proteínas Lhca1, Lhca2, Lhca3 y Lhca4 de los complejos antena del FSI están presentes en las VAS.

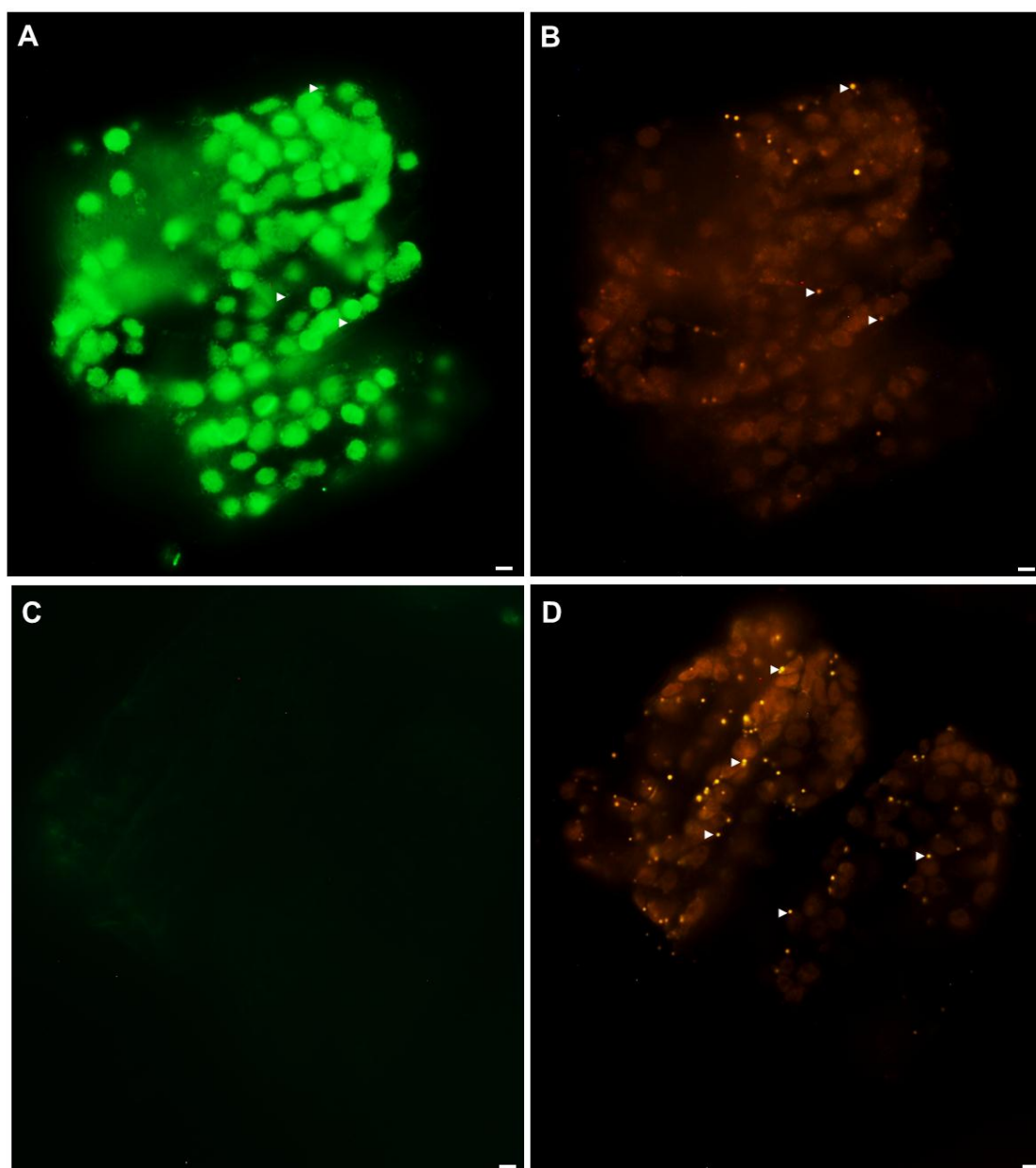


Figura 11: Inmunodetección de PsaA en VAS. Detección mediante inmunofluorescencia de PsaA en VAS de células de tabaco senescente (A) y control sin anticuerpo primario (C). *Lysotracker Red* (B y D). Microscopía de epi-fluorescencia. Barra: 5 μ m.

Mediante una técnica de inmunofluorescencia, especialmente ajustada para este ensayo, se inmunolocalizó PsaA en las VAS de células de hojas senescentes de tabaco (Fig. 11). La detección del anticuerpo contra PsaA se realizó utilizando un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexafluor 488. La mayor cantidad de señal de PsaA proviene de los cloroplastos dado que estos son el compartimiento donde normalmente se encuentra el fotosistema I. Además, se detectan VAS marcadas con *Lysotracker Red* que colocalizan con la señal de PsaA (Alexafluor). Este resultado confirma la presencia de PsaA en las VAS (Gómez *et al.*, en preparación) y refuerza la idea de que las VAS pueden estar involucradas en la degradación de algunas proteínas del Fotosistema I (v.g., PsaA) además de las proteínas del estroma del cloroplasto (v.g., Rubisco).

- Discusión

Degradación de Rubisco por proteasas cisteínicas en las VAS.

Datos bioquímicos previos mostraron que la actividad de proteasas cisteínicas se incrementa durante la senescencia de las hojas (Beyene *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007). Estudios de la expresión de genes asociados a la senescencia muestran que varias proteasas cisteínicas aumentan su nivel de expresión en esta etapa (Bhalerao *et al.*, 2003; Gregersen & Holm *et al.*, 2007; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004).

En este trabajo, se empleó un sistema de detección de proteasas cisteínicas basado en la actividad para revelar proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia, tanto en extractos crudos de hoja como en la fracción enriquecida en VAS. Las proteasas cisteínicas más abundantes del extracto crudo (proteasas de 40 y 33 kDa) también aparecen en las VAS sugiriendo que estas últimas tienen una participación importante en la actividad proteolítica de la célula durante la senescencia. Este dato es consistente con las observaciones de actividades de proteasas cisteínicas evidenciado por la hidrólisis de R6502 y con la localización de SAG12:GFP en las VAS de *Arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005) y tabaco (Fig. 10).

Hay evidencia de que algunas proteínas del estroma de los cloroplastos son re-localizadas a las VAS en el curso de la senescencia (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Las proteínas re-localizadas a las VAS pueden ser degradadas dentro de estas organelas *in vitro* (Martínez & Costa *et al.*, 2008) y la mayor parte de la degradación de Rubisco por las VAS *in vitro* puede ser inhibida con E-64 (Fig. 1), un inhibidor específico de proteasas cisteínicas.

La incubación de discos de tabaco con E-64 redujo sustancialmente la degradación de Rubisco *in vivo*, lo cual es consistente con la observación de que E-64 inhibe la mayor parte de la actividad proteolítica en hojas de tabaco (Beyene *et al.*, 2006). La degradación de la subunidad grande y pequeña de Rubisco de tabaco es inhibida por el tratamiento con E-64 tanto en un sistema *in vitro* como *in vivo* (Figs. 1 y 7). En un sistema similar, la proteólisis de LSU de Rubisco fue inhibida en hojas de trigo senescentes, tanto si la senescencia fue inducida por oscuridad o por deficiencia de nitrógeno (Thoenen *et al.*, 2007). La expresión de OC-1, una cistatina de arroz que inhibe la actividad de proteasas cisteínicas, en *Nicotiana tabacum* produce un retraso en la pérdida de actividad fotosintética y la actividad de Rubisco en comparación con la variedad salvaje (Prins *et al.*, 2008). Como se muestra en la Figura 7, E-64 inhibe la actividad de proteasas cisteínicas localizadas mayoritariamente en las VAS. Plantas de líneas *knock-out* de maíz para See2 β , una proteasa cisteínica del tipo “legumaina”, muestran un fenotipo de senescencia atenuada al presentar menores tasas de degradación de proteínas foliares y clorofila (Donnison *et al.*, 2007). Sin embargo es posible que proteasa no esté implicada en la degradación directa de estos componentes sino en la regulación de la removilización de N.

Proteasas cisteínicas en las VAS.

Aunque la identidad de las proteasas cisteínicas de las VAS no ha sido establecida, principalmente debido a la dificultad de obtenerlas en cantidades y pureza necesaria para emplear espectrometría de masas y a que el genoma de tabaco aún no ha sido totalmente secuenciado, es posible realizar algunas conjeturas al respecto. Dado que SAG12 se encuentra en las VAS de tabaco (Fig. 10) cabe esperar que al menos una de las bandas que se detectan en las VAS por western-blot corresponda a,

o contenga, SAG12. En hojas senescentes de *arabidopsis* se detectó una banda de 38 kDa reconocida por un anticuerpo contra SAG12 (Grbic, 2003). Esta proteína tiene un peso molecular muy cercano a la banda superior que se detectó en las VAS de tabaco (Fig. 3). Además, en la identificación de las proteasas cisteínicas del extracto crudo de hojas senescentes de cebada se encontró que SAG12 también está presente con un peso molecular de 39 kDa (datos no publicados). Para obtener esta proteasa de cebada se empleó la misma técnica que la utilizada para purificar las proteasas de tabaco.

En hojas de tabaco se encontró una proteasa específica de la senescencia denominada NTCP1 (Beyene *et al.*, 2006) que tiene una similitud del 99% en la secuencia con SAG12. En el análisis de expresión realizado mediante RTq-PCR, el patrón de expresión de NTCP1 y SAG12 fueron también semejantes, lo que junto a la similitud de secuencia nucleotídica, sugiere que NTCP1 y SAG12 podrían hacer referencia a la misma proteasa.

En hojas senescentes de *arabidopsis* se detectó la presencia de RD21, una proteasa cisteínica del tipo “papaína” que fue localizada en la vacuola central (Yamada *et al.*, 2001). Esta proteasa posee dos formas: una forma inmadura de 38 kDa con un dominio del tipo granulina y otra forma madura, activa, de 33 kDa sin este dominio. Esta proteasa en sus dos variantes tienen el mismo peso molecular que las proteasas detectadas en las VAS. Recientemente, también se localizó a RD21 en vesículas post-golgi y en pequeñas vesículas líticas en el endotelio de semillas inmaduras de *arabidopsis* en estudios sobre muerte celular programada (Ondzighi *et al.*, 2008). Además, en *Nicotiana tabacum* se detectó una proteasa cisteínica de tipo “aleuraina”, denominada NTCP23 (Q84YH8) que aumenta su expresión durante la senescencia y tiene un peso molecular de 32 kDa (Ueda *et al.*, 2000). Esta proteasa es similar a SAG2 en *arabidopsis*, una proteasa cisteínica asociada a la senescencia foliar (Grbic, 2003). En hojas senescentes de soja se detectó una proteasa cisteínica denominada GmCP3 del tipo “papaína” de 41 kDa que originalmente se había relacionado con la removilización de proteínas en la germinación del grano (Esteban-García *et al.*, 2010). La proteasa GmCP3 también se expresa en respuesta a estrés biótico y abiótico, lo cual indicaría una respuesta común con la senescencia.

En la bibliografía se han registrado numerosas proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia foliar, revelando la importancia de este tipo de proteasas en el

desmantelamiento celular y muerte celular programada. Sin embargo la mayoría de las proteasas cisteínicas estudiadas no han sido ubicadas en un compartimiento celular determinado, a excepción de algunas proteasas vacuolares. La detección y purificación de proteasas cisteínas en las VAS, junto con la detección de su actividad *in vitro* e *in vivo*, dan prueba sobre la localización de estas proteasas. La función de las VAS como compartimiento lítico asociado a la degradación de los cloroplastos, fue demostrada en este capítulo con el empleo de la sonda fluorescente R6502 y los experimentos *in vivo* de inhibición farmacológica de la acidificación de las VAS y de las proteasas cisteínicas.

Proteólisis extra-plastidial.

Los resultados de la inhibición *in vivo* con E-64 indican fuertemente la participación de proteasas cisteínicas en la degradación de proteínas fotosintéticas. La posibilidad de que las proteínas fotosintéticas sean degradadas por la actividad de proteasas cisteínicas localizadas en los cloroplastos parece poco probable. En la bibliografía, las proteasas cisteínicas con señal de dirección a cloroplastos son escasas. Por ejemplo, de 32 proteasas cisteínicas del tipo “papaínas” en *Arabidopsis*, solo dos (At2g27420 y At3g40340) están direccionadas a plástidos (Beers *et al.*, 2004). Una tercera proteasa cisteínica, At3g58710, ha sido detectada en cloroplastos de células no senescentes (Bayer *et al.*, 2011). Sin embargo, ninguna de estas proteasas tiene un aumento de expresión durante la senescencia (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). En el mismo sentido, en los cloroplastos se detectó escasa actividad de proteasas cisteínicas mediante el sustrato fluorescente R6502 (Fig. 7). De haber degradación parcial de Rubisco en los cloroplastos, hay evidencia que apunta a reacciones no enzimáticas donde están involucrados especies reactivas del oxígeno derivadas de los fotosistemas en degradación (Ishida *et al.*, 1998, 1999; Desimone *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2008). En hojas de *Pelargonium*, inducidas a senescer en oscuridad, además de presentar degradación acelerada de clorofilas también se registra un incremento concomitante de los niveles de ROS, seguido por el aumento de la expresión de la proteasa cisteínica Pe-SAG12.1 (Rosenvasser *et al.*, 2006). Algunos experimentos que muestran fragmentos de LSU en el cloroplasto emplean termolisina

para evitar la contaminación de proteasas libres, es decir, por proteasas presentes fuera de los cloroplastos (Bushnell *et al.*, 1993; Kokubun *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). Sin embargo, esta precaución solo contempla la contaminación de proteasas del citoplasma pero no evita la posible contaminación por proteasas presentes en vesículas que podrían acompañar a la fracción cloroplástica, como podrían hacerlo las VAS, con reportada actividad lítica. Entonces, estos fragmentos, no podrían ser inequívocamente atribuidos a una degradación de Rubisco ejecutada por proteasas cisteínicas cloroplásticas, como exponen algunos autores. En este sentido, sería necesario tomar otras precauciones para evitar contaminaciones y examinar rigurosamente la pureza de las fracciones de cloroplastos aislados.

El empleo de Concanamicina A como inhibidor de las H⁺-ATPasas vacuolares produce una reducción *in vivo* de la degradación de la proteínas durante la senescencia inducida por oscuridad (Fig. 8). Este fenómeno es bastante evidente en la subunidad grande Rubisco en donde además se retiene un fragmento de 50 kDa. Varios trabajos han reportado la aparición de un fragmento de 50 o 51 kDa como productos de la degradación intraplastidial durante la senescencia inducida por oscuridad (Zhang *et al.*, 2005; Thoenen *et al.*, 2007; Feller *et al.*, 2007). La retención de este fragmento de Rubisco por efecto de la Concanamicina A y la ausencia del mismo sin tratamiento, estaría sugiriendo una inhibición del mecanismo de degradación dependiente de la acidez. Dado que en la Figura 9 se demuestra que el efecto más evidente de la Concanamicina A ocurre en las VAS, es posible atribuir la degradación del fragmento de 50 kDa a un sistema extraplastidial protagonizado por las VAS. Esta evidencia pondría de manifiesto la importancia relativa de la participación de las VAS en la degradación de Rubisco durante la senescencia foliar.

Además de las degradación *in vitro* de Rubisco, las VAS también degradan PsA, una proteína del fotosistema I (Gómez *et al.*, en preparación). Ahora hay evidencia directa de la presencia de esta proteína en las VAS (Fig. 11) donde se observaron VAS con PsA de las cuales sólo algunas están marcadas con *Lysotracker Red*. Esto sugiere que una vez acidificadas las VAS (evidenciado por la tinción con *Lysotracker Red*) PsA sería rápidamente degradada. De esta manera se podría explicar la escasa co-localización del *Lysotracker Red* y PsA en las VAS. Este fenómeno también ocurre con la clorofila. Sólo algunas VAS marcadas con *Lysotracker Red* además tienen señal de

clorofila. El potencial de las VAS de degradar clorofila *in vitro* fue demostrado durante la senescencia de *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* (Gómez *et al.*, en preparación). La aplicación de etefón, un precursor químico del etileno, parece acelerar el proceso donde participan las VAS. Cuando no se emplea el etefón en la inducción de la senescencia, ésta transcurre más lentamente y es posible observar una mayor cantidad de *Lysotracker Red* colocalizando con clorofila en las VAS.

Estas observaciones sugieren que la naturaleza de las VAS no es uniforme en el tiempo y apunta a la existencia de un proceso dinámico donde los componentes del estroma cloroplástico van siendo degradados, esencialmente mediante proteasas del tipo cisteínicas. Como se mostró en el capítulo anterior, las VAS poseen componentes del Aparato de Golgi, lo cual apunta a que además de tener un origen en los cloroplastos, las VAS podrían originarse con contribuciones del Aparato de Golgi. Es posible que la capacidad lítica, determinada por la acidez y las proteasas cisteínicas, sean aportados por el Golgi con el fin de degradar componentes de los cloroplastos.

Autofagia y Vacuolas Asociadas a la Senescencia

Introducción

Las células, bajo ciertas situaciones fisiológicas y ambientales requieren la degradación parcial o total de sus componentes. Este proceso necesita de una compleja coordinación que incluye la integración de señales y el reclutamiento de numerosos componentes celulares. La autofagia, inicialmente interpretada como un mecanismo inespecífico de degradación en masa, se considera actualmente como un proceso multifacético y dinámico de degradación organizada de la célula (Li & Vierstra, 2012).

En plantas, el mecanismo de la autofagia está menos estudiado que en levaduras o animales, aunque está claro que posee algunas diferencias debido esencialmente a la presencia de la pared celular, la vacuola central y los cloroplastos en células vegetales. En animales, la autofagia está implicada en procesos de regeneración, cáncer y envejecimiento (Yang & Klionsky, 2010). Los primeros reportes de autofagia en plantas fueron realizados a fines de la década de los 60's como resultado de estudios en células del embrión, meristema de raíz y en la biogénesis de la vacuola central (Villiers, 1967; Marty, 1978). La autofagia en plantas está asociada a situaciones de estrés, infecciones, al reciclado normal de proteínas y estructuras celulares y al proceso de senescencia (Bassham *et al.*, 2006; Palmer 2007; Gregersen & Holm, 2007; Hayward & Dinesch-Kumar, 2011).

El Mecanismo de la Autofagia.

El mecanismo de la autofagia ha sido extensamente estudiada en levaduras y células animales (Li & Vierstra, 2012). La regulación de la autofagia está fuertemente asociada a la actividad de la proteína TOR quinasa (del ingles, *target of rapamycin*), que funciona como un sensor del estado nutricional de la célula. En condiciones donde existe un adecuado suministro de nutrientes, ATG1 ("*autophagy 1*") y ATG13 son hiperfosforilados por TOR impidiendo su conjugación. Pero en condiciones nutricionales limitantes la acción de TOR es inhibida y el complejo ATG1-ATG13 permanece unido para formar un complejo quinasa junto con las proteínas ATG11,

ATG17 y VAC8. El complejo quinasa resultante promueve la nucleación de una vesícula (“fagóforo”) por la activación directa o indirecta de VPS-34 (del inglés, *vacuolar protein sorting*). La membrana del “fagóforo” es enriquecida en fosfatidil-inositol 3-fosfato (PI3P), y la proteína transmembrana ATG9 contribuye al reclutamiento de lípidos en la membrana de la nueva vesícula. Luego, en la etapa de expansión y terminación del autofagosoma ocurre una serie de conjugaciones del tipo “ubiquitinación” mediadas por ATG7 y ATG3 (Yoshimoto *et al.*, 2004; Nakatogawa *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008). Como consecuencia se forman dos complejos: ATG4 permitirá la unión de ATG8 con fosfatidil-etanol-amina (PE) y junto al complejo ATG12-ATG quedarán asociados a la membrana de la vesícula. Posiblemente ATG8 interactúe con microtúbulos del citoesqueleto facilitando la movilidad del autofagosoma (Ketelaar *et al.*, 2004). Antes de la fusión del autofagosoma con la vacuola central, la proteasa ATG4 hidroliza a PE de ATG8 (Kirisako *et al.*, 2000). Posteriormente, en el proceso de internalización en la vacuola central, participa un complejo integrado por VTI1 (un v-SNARE, del inglés, *vesicle soluble n-ethylmaleimide factor protein receptor*), una syntaxina (VAM3) y una proteína de unión a GTP de la familia de las RAB quinasa. Finalmente, cuando la vesícula entra en la vacuola central se denomina “cuerpo autofágico”, y es degradado por lipasas (*v.g.*, ATG15) y diversas proteasas (Fig. 1).

Funciones de la Autofagia.

La expresión de los genes del sistema de autofagia ocurre de manera ubicua a lo largo de todo el ciclo biológico y en todos los órganos de *Arabidopsis*, indicando que esta vía no está restringida a una etapa o tejido de la planta (Thompson *et al.*, 2005). Análisis genéticos, observaciones microscópicas y tratamientos farmacológicos le atribuyen a la autofagia una participación central en diversos procesos fisiológicos, como la formación y degradación de vesículas de almacenamiento durante la germinación de semillas, biogénesis de la vacuola central, removilización de nutrientes durante la senescencia y estrés, procesos apoptóticos en la morfogénesis del xilema y en la respuesta hipersensible a patógenos (citado en: Moriyasu & Klionsky, 2004).

En general, se podría decir que el mecanismo de autofagia está presente en aquellos procesos que implican el movimiento en vesículas de componentes celulares hacia la vacuola central para su degradación o reciclado (Huang & Klionsky, 2002). En células en cultivo heterotrófico sometidas a una deficiencia de C, el estrés nutricional incrementa el nivel de expresión de los genes de autofagia (Contento *et al.*, 2004).

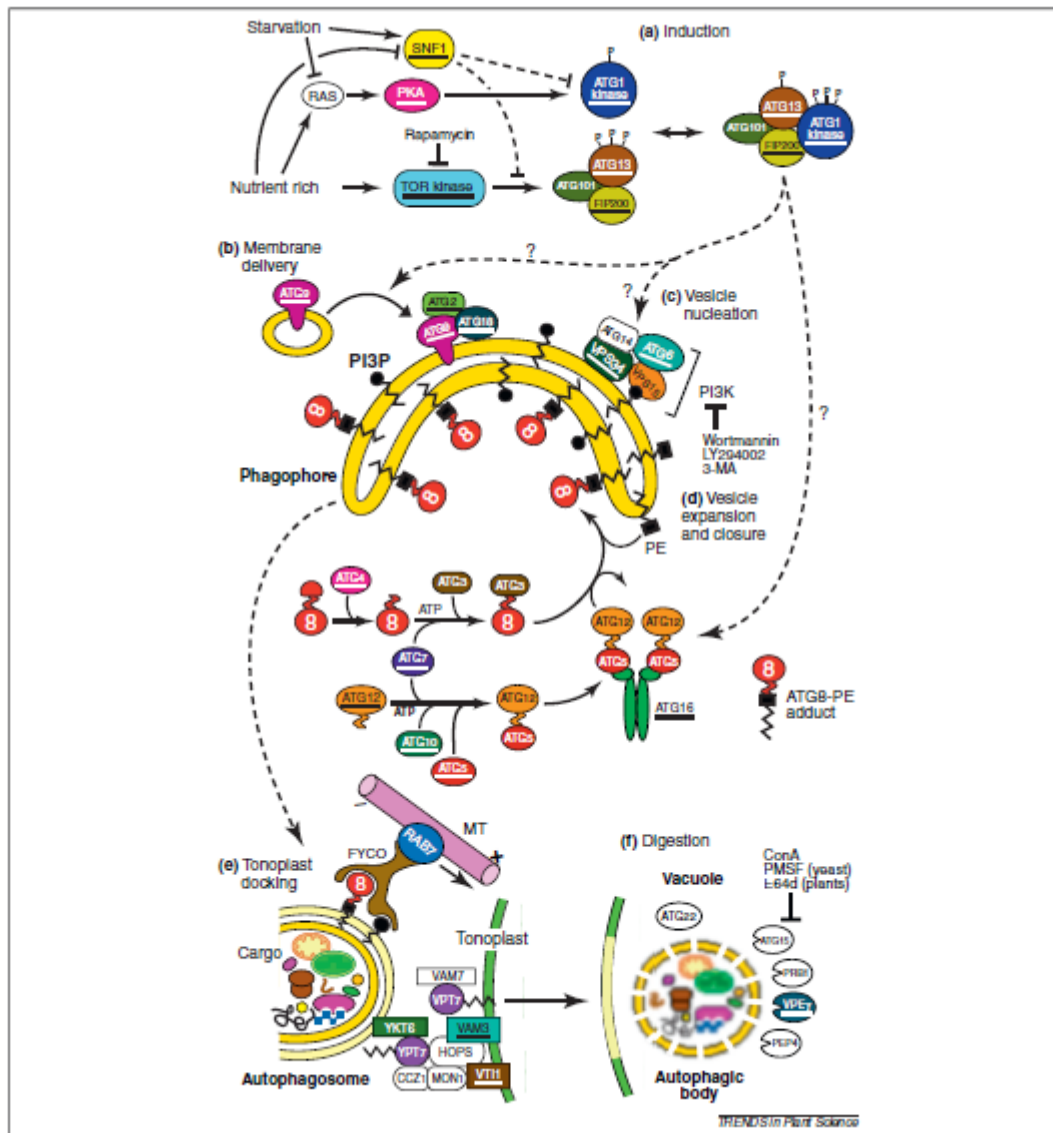


Figura 1: Esquema de los componentes conocidos de la autofagia en levaduras y Arabidopsis. Inducción de la autofagia (a); Formación del autofagosoma (b) y Fusión del autofagosoma al tonoplasto (c). Tomado de Li & Vierstra. 2012.

A pesar de ser un mecanismo ubicuo, y presumiblemente importante para las funciones básicas de las células, la inactivación de los genes de autofagia bajo

condiciones normales no es letal para las plantas. En cambio, la mutación de TOR (regulador negativo de la autofagia) tiene como consecuencia la muerte del embrión de la semilla, al des-reprimir la autofagia constitutivamente. Una posible explicación a la ausencia de mutaciones letales en genes de autofagia es que las familias de genes de autofagia pueden actuar, en algunos casos, de manera complementaria o redundante ante la pérdida de expresión de uno de sus miembros (Slavikova *et al.*, 2005). En cambio, hay genes implicados en la autofagia que no poseen genes redundantes reportados (v.g. atg5 y atg7). La inactivación de los genes atg4, atg5, atg7 y atg9 por inserción de T-DNA en plantas de Arabidopsis cultivadas en privación de N o C, causa floración temprana, senescencia foliar acelerada y un bajo rendimiento en semillas (Doelling *et al.*, 2002; Hanaoka *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005).

La función de la autofagia durante la senescencia natural o inducida por estrés es controversial. Esta contradicción ha llevado a postular dos funciones completamente antagónicas del sistema de autofagia en plantas. Por un lado, se postula una función pro-supervivencia de las células en situaciones de estrés y por el otro, se considera como parte fundamental en la muerte celular programada (tratado en Liu & Bassham, 2012).

Quienes sostienen la primera hipótesis se basan esencialmente en los datos aportados por la genética reversa, en los cuales las líneas donde la autofagia ha sido alterada negativamente presentan un síndrome de senescencia acelerado. Así, la autofagia promovería la supervivencia del tejido durante periodos de estrés mediante la removilización de nutrientes. Se ha reportado que algunos genes de autofagia son necesarios para la respuesta ante patógenos y que podrían regular negativamente la PCD durante la respuesta hipersensible (Liu *et al.*, 2005). En los mutantes de autofagia hay un aumento en la expresión de genes de la señalización del Ácido Salicílico lo que ha llevado a sugerir que la autofagia podría actuar como moduladora de la respuesta a SA durante la senescencia (Yoshimoto *et al.*, 2009).

El incremento de la expresión de los genes de autofagia en los primeros estados de senescencia, es el principal argumento de quienes sostienen su participación en la muerte celular programada. Se han observado estructuras autofágicas asociadas a la senescencia en tabaco y arabidopsis (Moriyasu *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 2009). El

numero y tamaño de los cloroplastos decrece en células de *arabidopsis* durante la senescencia, sin embargo en los mutantes de autofagia esto no ocurre (Wada *et al.*, 2009). Además, hay evidencia directa que apunta a la degradación de los cloroplastos a través de un mecanismo autofágico, donde estructuras del tipo autofagosomas denominadas RCB (del ingles, *Rubisco Containing Bodies*) transportan componentes del estroma hacia la vacuola central para su degradación (Ishida *et al.*, 2008). Hasta ahora, es evidente que ninguna de las interpretaciones sobre el rol de la autofagia en el desarrollo de las plantas aporta una explicación clara que integre las observaciones relevadas precedentemente.

Autofagia y la degradación de cloroplastos.

Como se introdujo en el primer capítulo de esta tesis, la degradación de los componentes cloroplásticos podría ocurrir dentro y/o fuera de los plástidos. La participación de un mecanismo de autofagia en el desmantelamiento del cloroplasto se ha sugerido en la bibliografía cada vez con más frecuencia, aunque sin resultados concluyentes (Minamikawa *et al.*, 2001; Chiba *et al.*, 2003; Niwa *et al.*, 2004; Prins *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009; Yamane *et al.*, 2012).

Hace varias décadas se sugirió que la degradación de componentes de cloroplastos podría ocurrir en la vacuola central (Matile, 1975; Wittenbach *et al.*, 1982). En hojas senescentes de soja, se registró la presencia de estructuras globulares, similares a los “plasto-glóbulos”, con fluorescencia de clorofila que parecían protruir desde los cloroplastos hacia el citoplasma (Guiamet *et al.*, 1999). También, mediante microscopía electrónica se inmunolocalizó Rubisco y Glutamina Sintetasa dentro de vesículas, denominadas RCB, en el citoplasma de hojas senescentes de trigo, lo cual avala la existencia de un mecanismo de degradación extraplástidial de componentes cloroplásticos (Chiba *et al.*, 2003). En plantas de *arabidopsis* inducidas a “senescer” en oscuridad, que expresan Rubisco fusionada a GFP se detectaron vesículas con Rubisco en la Vacuola Central que fueron atribuidas a las RCB (Ishida *et al.*, 2008). Las RCB no son detectables en las Vacuolas de plantas que poseen un inserto de T-DNA inactivando los genes *atg5* o *atg4*, esenciales para la autofagia. Esto indicaría que las

RCB requieren del mecanismo de la autofagia para su transporte a la vacuola central (Ishida *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009).

En plantas de *arabidopsis* con una inserción de T-DNA en *atg7*, tratadas con *Lysotracker Red* y R6502 (sustrato fluorescente de proteasas cisteínicas) se detectó un patrón punteado similar al de las VAS observado en el genotipo salvaje (Otegui *et al.*, 2005). El experimento sugirió que la biogénesis de las VAS sería, al menos, independiente de la proteína ATG7. Esta interpretación ha derivado en proponer dos vías hipotéticas para la degradación extraplastidial de componentes cloroplásticos: una vía dependiente de autofagia con las RCB y otra independiente de autofagia mediante las VAS (Wada & Ishida, 2009; Costa *et al.*, 2012).

El objetivo de este capítulo es analizar la relación entre la autofagia, las VAS y la senescencia. Se intentará dar una posible explicación a la aparente contradicción que representa la aceleración de la senescencia en los mutantes de la vía autofágica y finalmente, se evaluará la relación o independencia de las VAS y la autofagia.

- Resultados

5.1- Un mutante de la vía autofágica y el síndrome de la senescencia.

Los genes de autofagia aumentan su expresión cuando la senescencia es inducida por oscuridad, deficiencia de nitrógeno o ataque de patógenos (Li & Vierstra, 2012). Sin embargo, los mutantes de genes esenciales para la vía autofágica (*e.g.* atg5, atg7, atg10) en lugar de detener o retrasar el proceso de la senescencia, muestran una aceleración de la tasa de degradación de proteínas y clorofila (Thompson *et al.*, 2005, Phillips *et al.*, 2008). Esta contradicción ha puesto en cuestionamiento el rol de la autofagia en la senescencia.

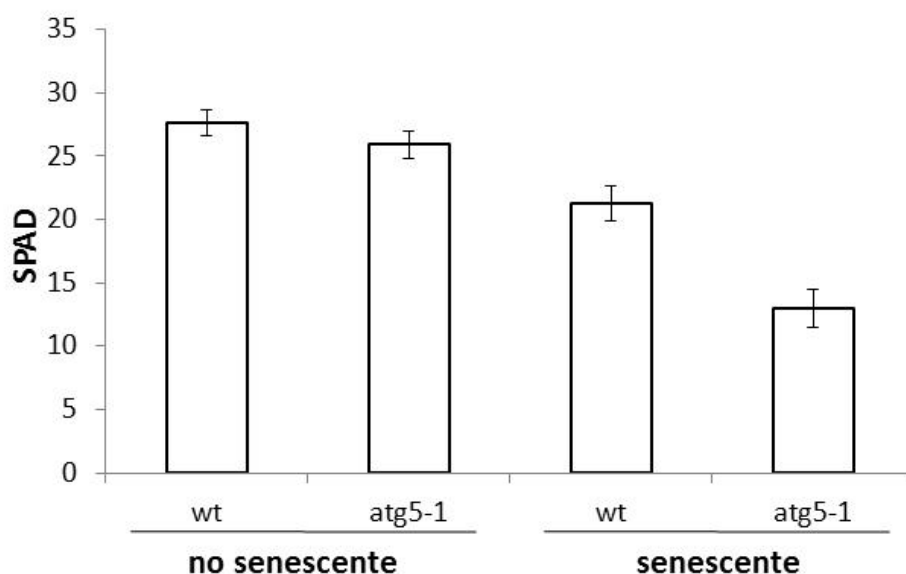


Figura 2: Caída de los valores de SPAD (clorofila) en hojas de Arabidopsis de genotipo salvaje (wt) y de una línea KO con la vía autofágica bloqueada (atg5-1), ambas tratadas con etefón e incubadas en oscuridad durante 72 h (senescente). Las barras representan el error estándar.

Se empleó el mutante atg5-1 que posee un inserto de T-DNA en uno de los componentes esenciales de la vía autofágica (Thompson *et al.*, 2005). El fenotipo más evidente de este mutante es la aceleración de la degradación de clorofilas y proteínas durante la senescencia. La aceleración de la degradación de clorofila en este mutante fue observado bajo el sistema experimental de senescencia inducida por corte de la

hoja, tratamiento con etefón e incubación en oscuridad. En la Figura 2 se muestran los valores de SPAD del genotipo salvaje y del mutante KO para ATG5 (*atg5-1*) de hojas maduras y senescentes. En el genotipo salvaje (*wt*) la incubación en oscuridad durante 72 h produjo una caída en el valor de SPAD del 20%, mientras que en el mutante de autofagia (*atg5-1*) la caída fue del 45% en el mismo periodo.

La aceleración de la degradación de las proteínas es otro de los síntomas frecuentemente observados en los mutantes de la vía autofágica. Para evaluar esto, se extrajeron las proteínas totales de hojas de *Arabidopsis thaliana* *wt* y *atg5-1* en buffer de muestra 1x (Laemmli, 1970). Las muestras fueron sembradas en un gel SDS-PAGE con cantidades de proteína que representaban iguales áreas foliares en cada calle del gel de electroforesis. En la Figura 3 se muestra el gel de SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue* donde se observan los patrones de proteínas de hojas incubadas en oscuridad durante 72 h. Las bandas de la subunidad grande de Rubisco (LSU) y la subunidad pequeña de Rubisco (SSU) correspondientes a *atg5-1* tienen una menor intensidad que las bandas correspondientes en el genotipo salvaje. Contrariamente, se observa una mayor intensidad del resto de las proteínas en *atg5-1* respecto al *wt*. Además, aparece una nueva banda en el perfil de proteínas de *atg5-1* con aproximadamente 21 kDa que no fue identificada.

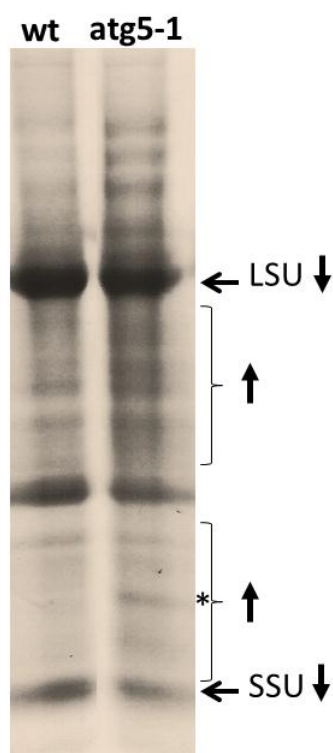


Figura 3: Perfil de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo salvaje (*wt*) y un mutante de la vía autofágica (*atg5-1*) luego de tratamiento con etefón e incubación durante 72 h de oscuridad. Las subunidades grande (LSU) y pequeña (SSU) de Rubisco muestran una degradación acelerada en *atg5-1*. En cambio, otras bandas aumentan su intensidad en *atg5-1* (flechas hacia arriba). El asterisco marca una banda de proteínas que aparece sólo en *atg5-1*.

Este resultado confirma que la degradación de Rubisco se acelera en el mutante de autofagia. Sin embargo, la medición densitométrica del contenido de proteínas evidencia que *atg5-1* retiene un contenido total de proteínas un 23% mayor que el *wt* luego de 3 días de oscuridad.

5.2- Alteración en la translocación de aminoácidos en *atg5-1*.

El proceso de autofagia concluye con la transferencia de proteínas y péptidos a la vacuola central, donde actúan endopeptidasas que pueden completar la degradación hasta liberar aminoácidos (Yang *et al.*, 2006). Luego, los aminoácidos pueden ser empleados por la célula para la síntesis de nuevas biomoléculas o para la exportación a otras partes de la planta dependiendo del estado fisiológico de la misma.

Se analizó la retranslocación de aminoácidos en hojas de *Arabidopsis thaliana* inducidas a “senescer” en oscuridad durante 48 h. Se procedió a tapar dos hojas maduras por planta con papel de aluminio mientras que el resto de las hojas que no fueron tapadas se tomaron como controles no senescentes. Este tratamiento (“individually darkened leaves”, IDL) es frecuentemente utilizado para acelerar la senescencia de hojas adheridas a la planta (Weaver *et al.* 2001). Luego de la inducción de la senescencia se obtuvo el exudado floemático con una técnica adaptada de Urquhart & Joy (1981) y se cuantificó el contenido de aminoácidos totales con el método de la reacción con Ninhidrina (Moore, 1968).

En la Figura 4 se muestra el contenido de aminoácidos totales del exudado floemático de hojas tapadas durante 48 h del mutante de autofagia, del genotipo salvaje y sus controles no senescentes (hojas normalmente expuestas a la luz). En las hojas *wt* sometidas a oscuridad (tapadas) se registró un aumento del 25% en el contenido de aminoácidos en el exudado floemático. Esto muestra que la senescencia inducida por oscuridad produjo un incremento significativo en la exportación de aminoácidos desde las hojas. Es probable que esos aminoácidos representen, al menos parcialmente, el producto de la degradación de proteínas cloroplásticas.

En el caso de las hojas tapadas del mutante de autofagia, el contenido de aminoácidos del exudado floemático se mantuvo en los mismos niveles que las hojas

no tapadas (no senescente). Sin embargo, los valores de SPAD de las hojas mutantes tapadas (senescentes) fueron menores que las hojas tapadas del genotipo salvaje demostrando que respondieron a la oscuridad degradando clorofila pero que la degradación de proteínas no se reflejó en un aumento de la exportación de aminoácidos. Este resultado sugiere que la anulación de la autofagia tiene como consecuencia que las hojas no retranslocan aminoácidos, a pesar de estar degradando clorofila (y presumiblemente otros componentes cloroplásticos) más rápidamente que el *wt*.

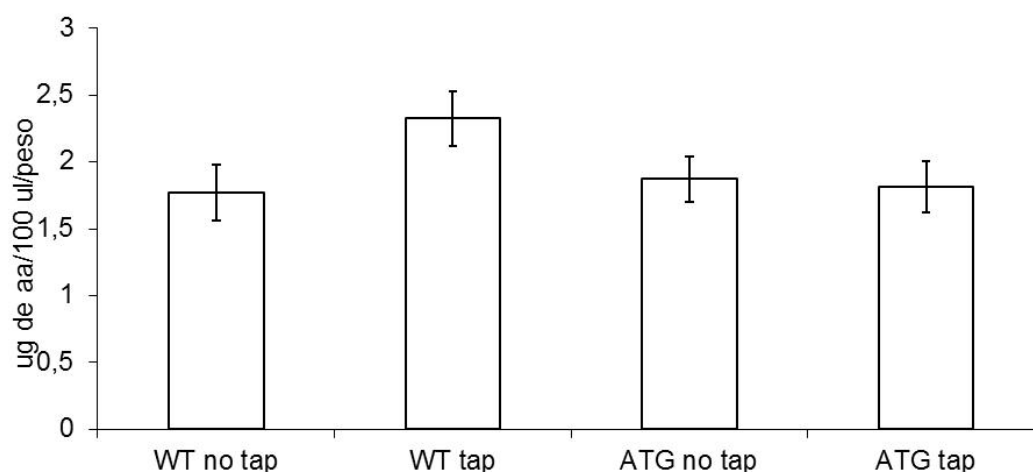


Figura 4: Contenido de aminoácidos totales del exudado floemático de hojas tapadas (senescente) y no tapadas (no senescente) de *Arabidopsis thaliana* del genotipo salvaje (WT) y del mutante de autofagia (ATG). Las barras representan el error estándar de cada tratamiento.

5.3- La inactivación de la autofagia produce un cambio en el patrón de marca de *Lysotracker Red* en células senescentes.

En forma similar al experimento realizado por Otegui *et al.* con una línea KO para *atg7* (2005), se analizó el patrón de las VAS en hojas senescentes de *Arabidopsis* de genotipo salvaje (*wt*) y en el mutante *atg5-1*.

Se trabajó con hojas maduras de *Arabidopsis wt* y *atg5-1* y se indujo la senescencia con un tratamiento de etefón inicial y almacenamiento en oscuridad durante 48 h. Luego de obtener células, éstas fueron tratadas con *Lysotracker Red* para

detectar los compartimientos ácidos y con R6502 para detectar compartimientos líticos.

Las microfotografías confocales mostraron en el genotipo *wt* vesículas de dos tamaños: de aproximadamente 970 nm y de 590 nm en promedio. Pero en el genotipo *atg5-1* las vesículas de 970 nm fueron escasas o ausentes mientras que las vesículas pequeñas fueron abundantes (Fig. 5). El patrón de distribución espacial en ambos genotipos fue similar, vesículas ácidas rodeando los cloroplastos senescentes, sin embargo, la diferencia en tamaño fue apreciable. En las células de *atg5-1*, la marca de *Lysotracker Red* estuvo menos definida que en *wt* lo cual dificultó la cuantificación de las vesículas. En el mutante también se observó frecuentemente la agrupación de vesículas pequeñas de manera tal que sus límites perdían discreción. Varias vesículas grandes también colocalizaron con la señal de clorofila por lo que se las puede definir como VAS. Para facilitar la comprensión de estos resultados, el término “vesículas pequeñas” estará restringido a las descritas aquí.

En la cuantificación de los tamaños, se evidenció que la distribución de tamaños entre el genotipo salvaje y el que posee la vía de la autofagia bloqueada, son diferentes (Fig. 5). En promedio, se encontraron dos poblaciones de vesículas, de 590 nm y 970 nm de diámetro. El amplio desvío estándar de la población de vesículas en el *wt* se debe a la coexistencia de las dos poblaciones (Fig. 6).

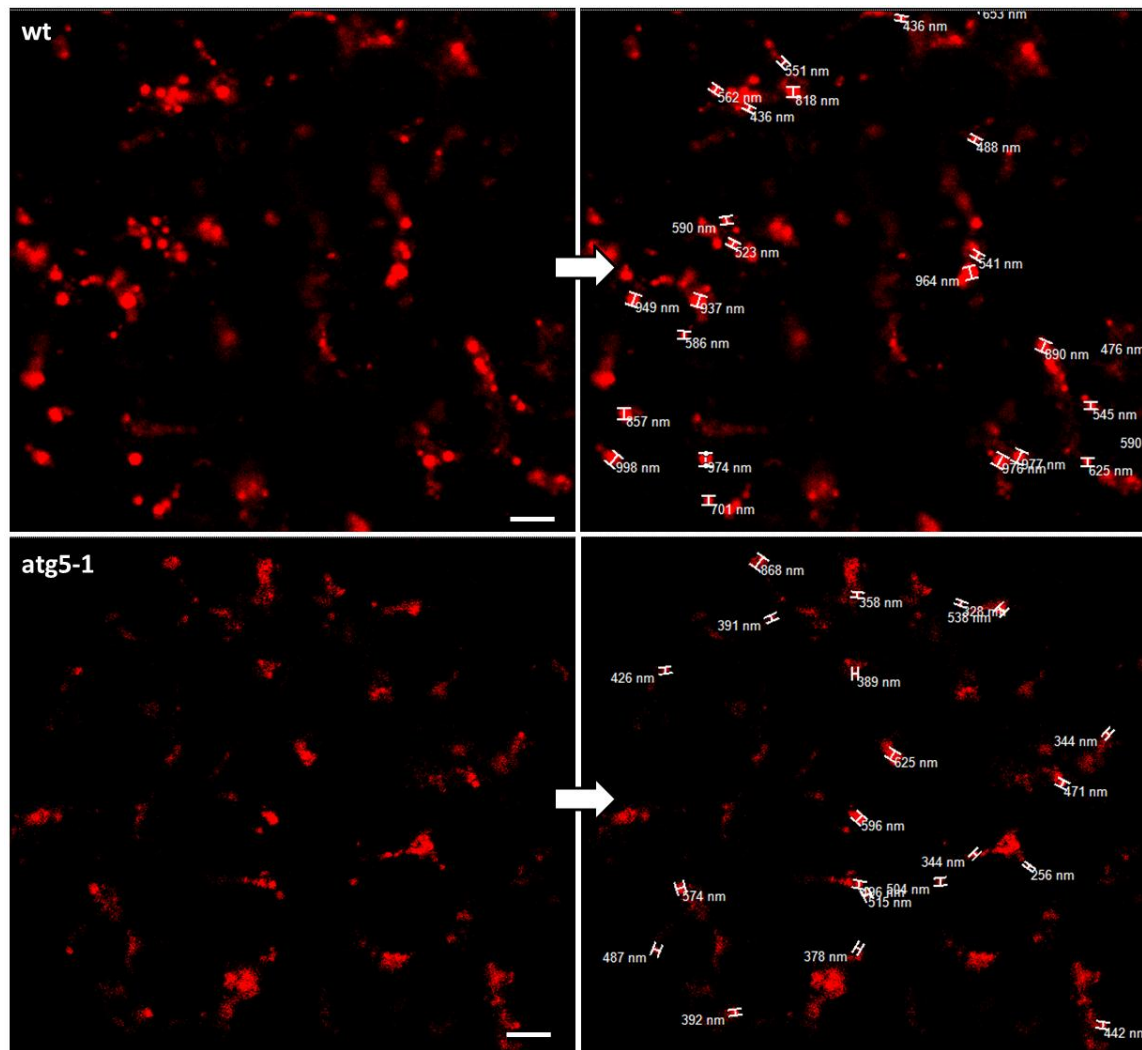


Figura 5: Variación del tamaño de las VAS entre el genotipo salvaje y *atg5-1* de *Arabidopsis thaliana*. Microfotografía confocal de células senescentes marcadas con *Lysotracker Red*. Imágenes pseudocoloreadas: *Lysotracker Red* en rojo. En las imágenes de la derecha se muestran las mediciones del diámetro de las vesículas. Barra: 5 μm.

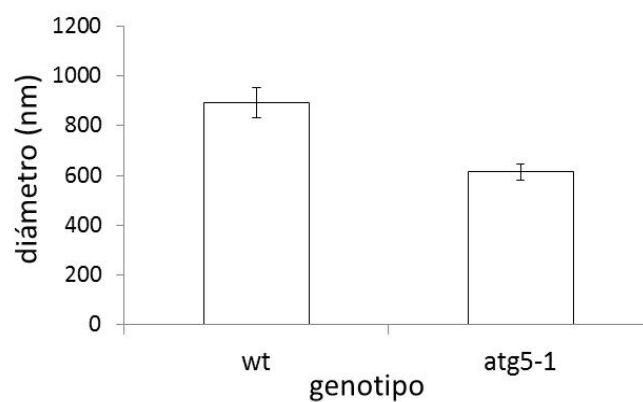


Figura 6: Distribución de tamaños de las vesículas marcadas con *Lysotracker Red* en el genotipo salvaje y *atg5-1* de *Arabidopsis thaliana*. Las barras representan el error estándar de cada población. Cuantificación de 10 células por genotipo. El diámetro está expresado en nanómetros.

Tanto las vesículas grandes como las pequeñas detectadas con *Lysotracker Red*, también poseen actividad lítica, como lo mostró la detección de la sonda R6502 (Fig. 7). Los cloroplastos también parecen contener señal de R6502, aunque con menor intensidad. El análisis del espectro de emisión de esta señal en los cloroplastos mostró que es coincidente con el espectro de emisión del R6502.

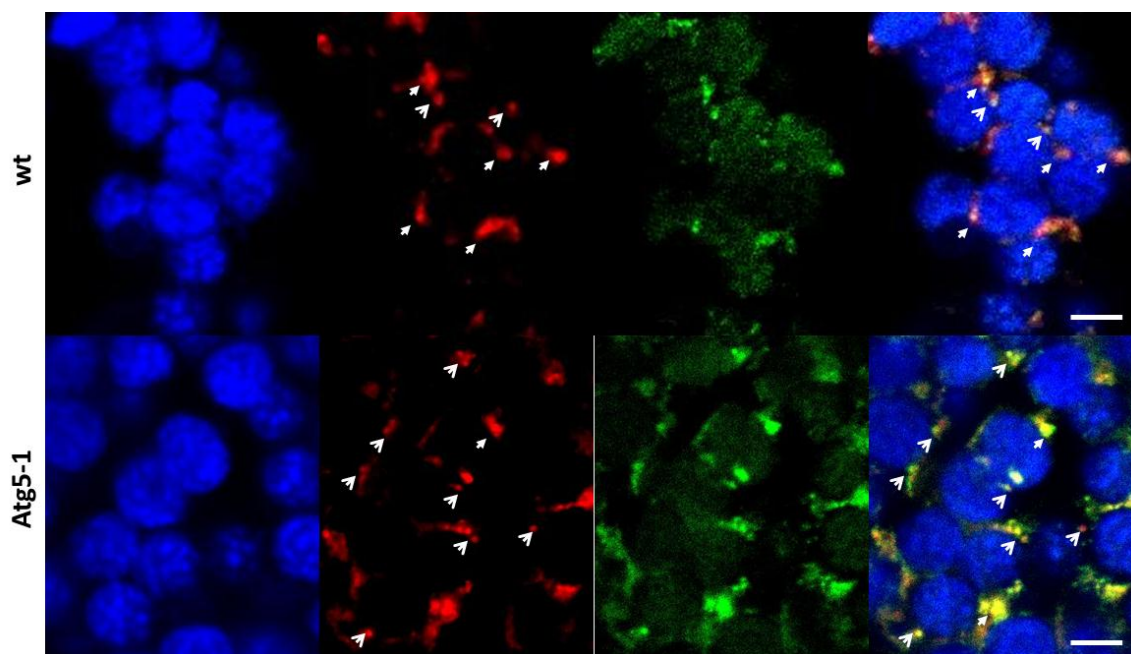


Figura 7: Detección de actividad de proteasas cisteínicas en las VAS mediante R6502 en células senescentes de *Arabidopsis thaliana* salvaje y atg5-1. Microfotografías confocales pseudocoloreadas de azul (clorofila), rojo (*Lysotracker Red*) y verde (R6502). Barra: 5 µm.

5.4- Detección de ATG8 en las VAS.

Como se describió en la introducción de este capítulo, ATG8 es una proteína que se asocia a fosfatidil-etanol-amina durante la formación de estructuras autofágicas en levaduras, plantas y animales (Fig. 1). ATG8 se localiza en la membrana externa del autofagosoma, y aparentemente es importante para su tránsito hacia la vacuola central. Ha sido empleado ampliamente como marcador de autofagosomas, tanto fusionado a la proteína verde fluorescente como mediante su detección con *inmunoblots* (Mitou *et al.*, 2009).

Para evaluar la participación de la autofagia en el desarrollo de las VAS, se empleó una construcción de ATG8a fusionado a GFP bajo control del promotor 35S en

plantas de *Arabidopsis thaliana* (en NASC, N39996; Thompson *et al.*, 2005). El producto de la construcción fue detectado mediante *Western-blot* obteniendo como resultado una banda específica de 40 kDa (14 kDa de ATG8 + 26,9 kDa de GFP, Fig. 8) y dos bandas inespecíficas de las cuales una pertenece a LSU y la otra no ha sido identificada (Yang *et al.*, 2006).

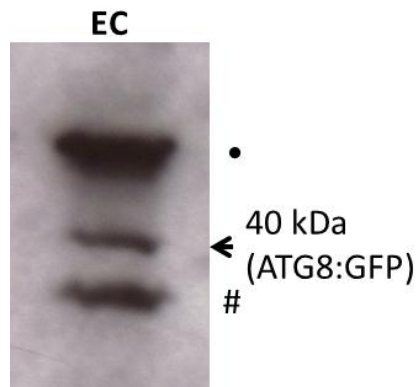


Figura 8: Inmunodetección de ATG8 en el extracto crudo (EC) de *Arabidopsis thaliana* con la construcción ATG8:GFP. Señal inespecífica en LSU (punto) y de una proteína no identificada (numeral).

Empleando el mismo protocolo para la visualización de las VAS que en Otegui *et al.* (2005) en el genotipo de ATG8:GFP se detectaron VAS con señal de clorofila, *Lysotracker Red* y ATG8:GFP (Fig. 9).

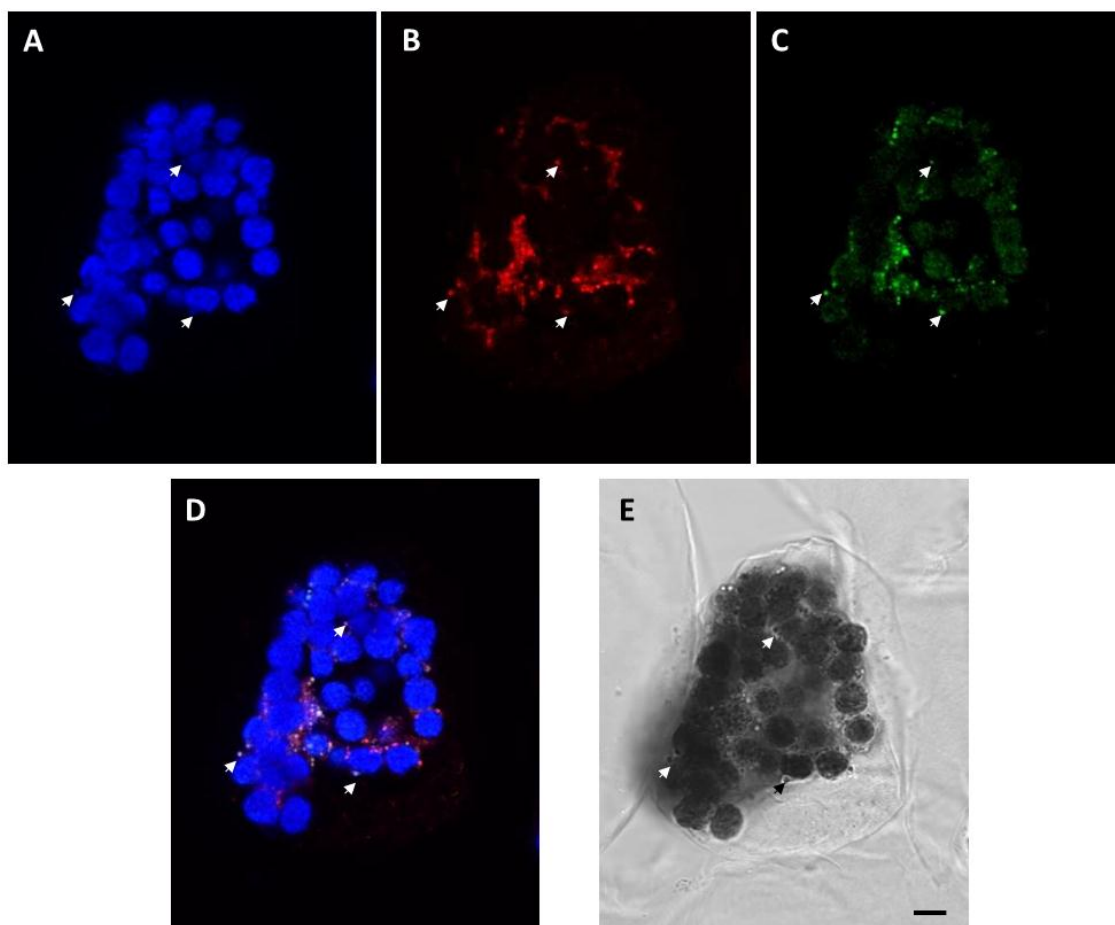


Figura 9: Detección de ATG8:GFP en VAS de células senescentes de *Arabidopsis thaliana*. Las flechas indican VAS con colocalización de clorofila (azul, A), *Lysotracker Red* (rojo, B) ATG8:GFP (verde, C). La combinación de los distintos canales se muestra en la Figura D, y el campo claro en la Figura E. Barra: 5µm.

La mayoría de las VAS detectadas con *Lysotracker Red* también presentaban la señal de GFP. Sólo algunas VAS poseen además clorofila, como sucede normalmente con el resto de las observación realizadas. En este experimento también se evidenció la presencia de las “vesículas pequeñas” donde colocalizan la señal de *Lysotracker Red* y GFP, pero está ausente la clorofila. La Figura 9E muestra que los marcadores fluorescentes colocalizan en el campo claro con vesículas.

Este mismo patrón de colocalización de las VAS con el marcador de autofagia ATG8, se observó en trozos de tejido de hojas senescentes de *Arabidopsis* que expresan ATG8:GFP (Fig. 10).

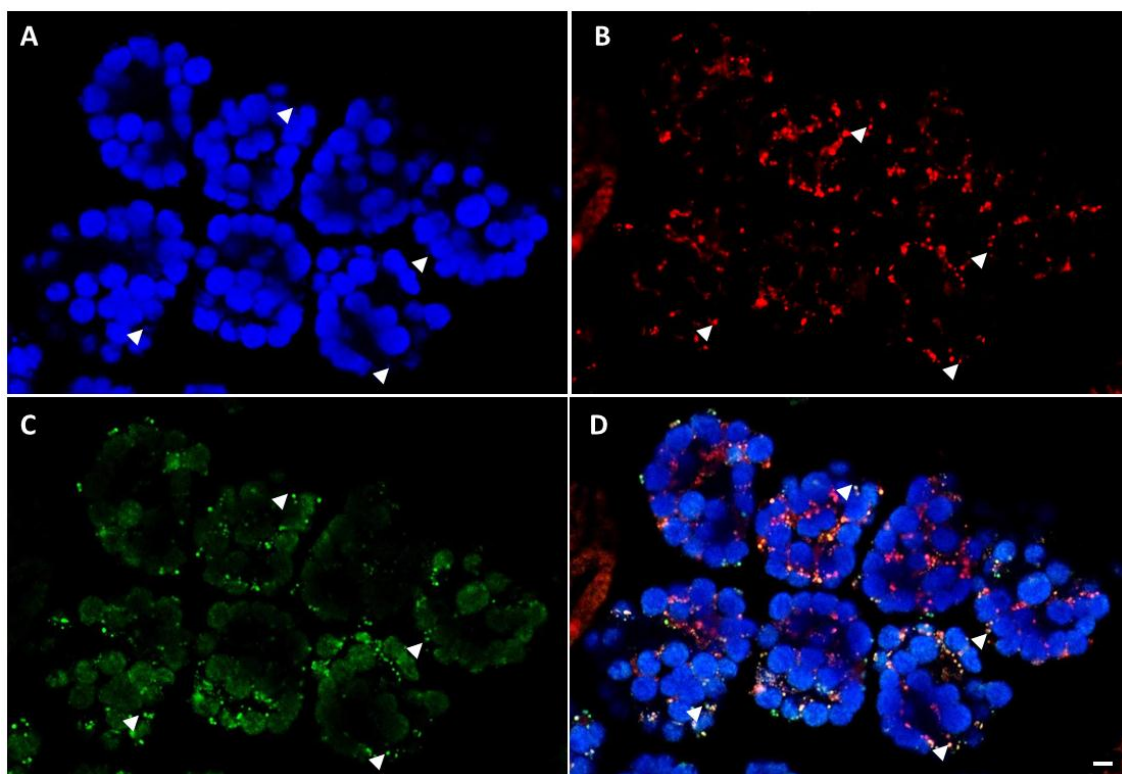


Figura 10: Colocalización de clorofila, *Lysotracker Red* y ATG8:GFP en VAS. Microfotografía confocal de tejido de hoja senescente de *Arabidopsis thaliana*. Las flechas indican VAS con colocalización de clorofila (azul, A), *Lysotracker Red* (rojo, B) ATG8:GFP (verde, C). La combinación de los distintos canales se muestra en la Figura D, y el campo claro en la Figura E. Barra: 5µm.

El ritmo de senescencia de las células de un mismo tejido, incluso aquellas que están contiguas entre sí, no es siempre el mismo. A pesar de emplear un método de senescencia inducida por oscuridad y etefón, es frecuente encontrar células vecinas en estados más o menos avanzados de la senescencia, lo cual permitió disponer de un control negativo interno de la presencia de las VAS detectadas mediante *Lysotracker Red* y ATG8:GFP. Así en la Figura 11, se muestran células senescentes con VAS y células no senescentes vecinas sin la presencia de las señales de *Lysotracker Red* y GFP. En las células donde las VAS están ausentes, los cloroplastos tienen una morfología normal y mayor intensidad de la señal de clorofila.

Esta observación revela que a pesar de que ATG8:GFP está bajo el control del promotor 35S constitutivo, sólo se detecta en células senescentes y se localiza en las VAS.

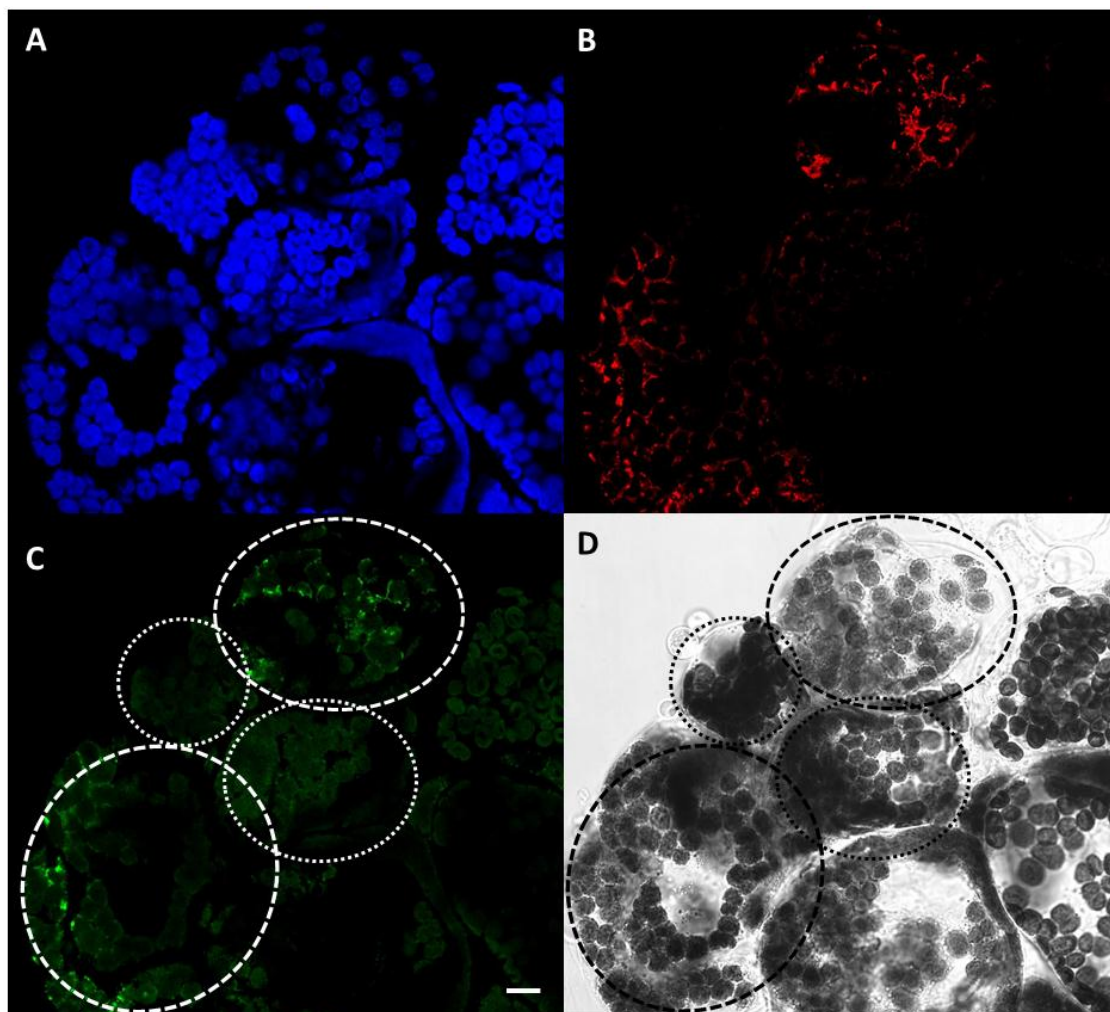


Figura 11: ATG8:GFP sólo se detecta en células senescentes. Con óvalos punteados se señalan células no senescentes que poseen una mayor intensidad de la señal de clorofila pero carecen de VAS. En los óvalos con rayas se señalan las células senescentes con señal de ATG8:GFP y *Lysotracker Red*. Microfotografías confocales pseudocoloreadas: azul (clorofila), rojo (*Lysotracker Red*), y verde (ATG8:GFP). Barra: 5 μ m.

La presencia de ATG8 en las VAS fue confirmada mediante la técnica de *Western-blot* empleando un anticuerpo contra ATG8a de *Arabidopsis thaliana* (Abcam®).

Para la inmunodetección se empleó la fracción enriquecida en VAS (F3) (Martínez & Costa *et al.*, 2008) de hojas de tabaco que fueron inducidas a “senescer” con aplicación de etefón e incubación en oscuridad durante 48 h. Luego de obtener la F3, se la concentró (F3c) mediante una dilución de la densidad del medio y centrifugación hasta obtener las VAS en un precipitado, el cual fue resuspendido en

buffer muestra 2X (sección 2.1.6). En el gel de acrilamida, se procuró sembrar la misma cantidad de proteína en el EC y la F3c.

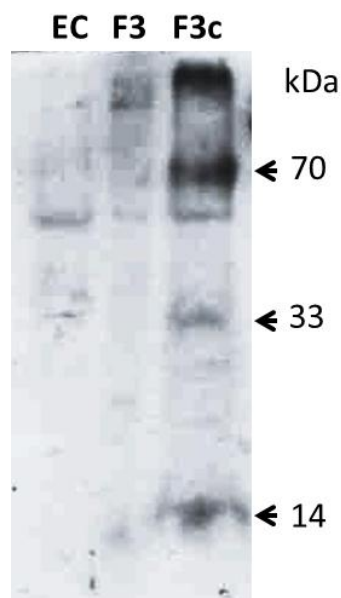


Figura 12: Inmunodetección de ATG8 en las VAS de *Nicotiana tabacum*. Western-blot de extracto crudo de hoja (EC), fracción enriquecida en VAS (F3) y fracción enriquecida en VAS concentrada (F3c). Las flechas indican los pesos moleculares de las principales bandas detectadas con el anticuerpo contra ATG8a. Se sembraron 15 µg de proteína en el EC y F3c.

La técnica de *western-blot* permitió detectar tres bandas de 14, 33 y 70 kDa sólo en la fracción enriquecida en VAS y concentrada (Fig. 12). La banda de 14 kDa corresponde a ATG8 como muestra la bibliografía (Thompson *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2005; Mitou *et al.*, 2009). Las bandas de 33 y 70 kDa podrían ser dímeros y tetrameros de ATG8 que se corresponderían a formas activas en las membranas de estructuras autofágicas (Nakatogawa *et al.*, 2007).

El extracto crudo empleado en este *western-blot* es el utilizado para el aislamiento de las VAS. La única banda detectada en el EC corresponde al peso molecular de la subunidad grande de Rubisco (LSU), por lo que se supone que esa marcación fue inespecífica. Sin embargo, la banda de LSU resulta útil para evidenciar que el contenido de proteínas del EC y la F3c son aproximadamente similares.

- **Discusión**

¿La disrupción de la autofagia acelera la senescencia?

Se ha reportado que la expresión de los genes de autofagia aumenta durante la senescencia foliar, lo cual sugiere que la autofagia tiene un papel en ese proceso (Rose *et al.*, 2006; van der Graaf *et al.*, 2006; Htwe *et al.*, 2011; Li & Vierstra, 2012). Estudios citológicos muestran numerosas estructuras autofágicas en el citoplasma y vacuola central de células senescentes de *Arabidopsis* (Xiong *et al.*, 2005; Contento *et al.*, 2005; Wada *et al.*, 2009) y trigo (Chiba *et al.*, 2003; Kuzuoglu-Ozturk *et al.*, 2012), entre otras especies. Sin embargo la disrupción del mecanismo de autofagia mediante la inserción de T-DNA en sus genes esenciales (*knock out*), en lugar de retrasar o bloquear la senescencia, tiene como consecuencia la aceleración de la misma. De hecho, la expresión de algunos genes marcadores de la senescencia foliar como SEN1 y SAG12 aumentan más tempranamente en los *knock out* de autofagia que en el genotipo salvaje (Hanaoka *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2009). Los principales síntomas de la senescencia ocurren tempranamente en los *knock out* de autofagia. El contenido de proteínas estimado mediante la técnica de Bradford y por SDS-PAGE decae más rápidamente en *atg9-1*, *atg7-1*, *atg5-1* y *atg10-1* que en *wt* (Hanaoka *et al.*, 2002; Doelling *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2008, respectivamente). La aceleración de la degradación de clorofila parece ser más intensa y evidente que la caída de proteínas en estos *knock out*, manifestándose por un amarillamiento temprano de las hojas. Sin embargo, asociar de manera directa la pérdida de color de la clorofila con la autofagia podría ser al menos arriesgada, dado que el cloroplasto posee la maquinaria necesaria para producir derivados incoloros de la clorofila de manera independiente (Hörtensteiner, 2006). Es probable que la aceleración de la degradación de clorofila sea un efecto indirecto de la disrupción de la autofagia.

En la Figura 3 se mostró, coincidentemente con otros autores (Doelling *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005), que las subunidades pequeña y grande de Rubisco se degradan más rápido en *atg5-1* que en *wt*. Sin embargo el contenido total de proteínas estimado por la densidad de la marca en el gel de acrilamida, revela que la hoja de *atg5-1* retiene aproximadamente un 23 % más de proteínas en relación al genotipo

salvaje (Fig. 3). Este resultado sería contradictorio al reportado en la bibliografía, pero el análisis detallado de los perfiles de proteínas mostrados por los autores citados indica que: 1- hay una disminución significativa en la intensidad en las bandas (concentración) de alto peso molecular (*e.g.* LSU); 2- las bandas de menor peso molecular no disminuyen su intensidad (en algunos casos con la excepción de SSU); 3- se produce la acumulación de péptidos y proteínas de diversos tamaños evidenciados por un manchado de fondo por debajo de los 40 kDa. El análisis densitométrico de los geles mostrados en esos trabajos (Doelling *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2008) evidenció que el contenido de proteínas estimados integrando la intensidad de todas las bandas proteicas en *wt* y los *knock out* de autofagia son muy similares. En el caso del trabajo de Thompson *et al.*, 2005 donde emplea el mutante *atg5-1*, el mismo utilizado en la Figura 3, el contenido total de proteínas en el gel es un 20% mayor en el mutante que en el *wt*. Esta observación no fue realizada en su momento por los autores, quienes sólo mencionan una aceleración de la degradación de proteínas de los mutantes de autofagia. El corrimiento hacia menores masas moleculares de las bandas de proteínas detectadas en los geles de electroforesis, podría sugerir una degradación incompleta de proteínas durante la senescencia cuando la autofagia está bloqueada ¿Qué hidrolasas, estructuras o procesos serían responsables de la degradación parcial de las proteínas cloroplásticas en las líneas KO para la autofagia? Varios trabajos demuestran la existencia de endoproteasas en el estroma o la membrana externa de los cloroplastos que podrían degradar parcialmente D1 y Rubisco (Sakamoto *et al.*, 2006; Feller *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2009). Los cloroplastos poseen la capacidad de proteólisis para el reciclado de proteínas dañadas, aunque durante la senescencia se incrementa la expresión y cantidad de proteasas denominadas Clp y FtsH (Thoenen & Feller, 1998; Schiltz *et al.*, 2004; Rudella *et al.*, 2006; Desclos *et al.*, 2009; Gou, 2012). Sin embargo, la escasez de evidencias funcionales, dificulta sostener la participación de los cloroplastos en la degradación de proteínas durante la senescencia.

Por otro lado, en el mutante *atg5-1* se detecta actividad de proteasas cisteínicas y acidez en vesículas pequeñas y estructuras similares a las VAS que bien podrían sugerir que la vía de degradación extraplastidial del cloroplasto está

funcionando (Fig. 7). Aunque las diferencias en el patrón de marca del *Lysotracker Red* mostrado en la Figura 6 muestra que el mutante *atg5-1* produce una alteración en la vía extraplastidial. Entonces, la degradación parcial de proteínas y la falta de exportación de aminoácidos en el mutante *atg5-1* podría guardar relación con la alteración de la vía extraplastidial para el desmantelamiento de los cloroplastos.

Se ha sugerido que las VAS podrían descargar su contenido en la Vacuola Central como última etapa de su desarrollo, para finalizar la degradación de las proteínas (Martínez & Costa *et al.*, 2008). Dado que se ha mostrado que las VAS poseen ATG8 (Figs. 9-11), y que este componente de la autofagia es necesario para el direccionamiento y la entrada a la Vacuola Central (Chung *et al.*, 2010), el bloqueo de la autofagia (v.g. *atg5-1*) podría impedir la degradación completo de las proteínas estromáticas en la vía de las VAS. Esta hipótesis servirá para el diseño de futuros experimentos que apunten a establecer la relación entre las VAS y la Vacuola Central.

Normalmente durante la senescencia de las hojas, la degradación de proteínas conlleva a la exportación de aminoácidos a otros órganos (Brouquisse *et al.*, 2000; Horternsteiner & Feller, 2002; Soudry *et al.*, 2005). En consonancia con los resultados propios y de otros autores (aunque no descriptos como tales en sus trabajos) donde una disrupción de la autofagia impediría la degradación completa de proteínas, la Figura 4 muestra cómo en este mismo mutante está reducida la retranslocación de aminoácidos durante la senescencia. En este mismo sentido, la mutación *atg9-1* en *Arabidopsis* posee un fenotipo de clorosis acelerada y reducción en el número de semillas, en condiciones de bajo nitrógeno (Hanaoka *et al.*, 2002). Según los autores, este fenotipo es producto de un ineficiente mecanismo de removilización de nutrientes desde las hojas. En el mismo sentido, marcando las proteínas foliares con ¹⁵N, Guiboileau *et al.* (2012) encontraron que la eficiencia de removilización de N desde las hojas senescentes fue marcadamente menor en *atg5-1* que en el genotipo *wt*, y como consecuencia de esto los restos vegetativos senescentes de *atg5-1* retuvieron mayores niveles porcentuales de N.

Dado que la cantidad de aminoácidos en las células de la hoja y en floema están en un relativo equilibrio (Winter *et al.*, 1992), de haber ocurrido la degradación completa de las proteínas en el mutante de autofagia, debería ocurrir un incremento

en el contenido de aminoácidos en el exudado floemático. Pero como se muestra en las Figuras 3 y 4 esto no es así en el mutante *atg5-1*. Entonces, el bloqueo del mecanismo de autofagia podría impedir la degradación completa de las proteínas que normalmente son degradadas a aminoácidos para posteriormente ser exportadas. Este fenómeno podría hacer replantear la idea presente en la bibliografía de que en las plantas con la vía autofágica bloqueada, la senescencia se acelera. Si se define a la senescencia como un proceso organizado de desmantelamiento celular (degradación de proteínas, clorofila, etc.), entonces el bloqueo de la autofagia está acelerando la senescencia. Pero si se la define de acuerdo a su función en la removilización de nutrientes, entonces el bloqueo de la autofagia no está acelerando la senescencia, sólo está estimulando la primera etapa de la degradación parcial de proteínas que al no concretarse en el aumento del *pool* de aminoácidos sufre una retroalimentación positiva. Dado que la senescencia no es inducida por la degradación de proteínas y clorofila sino por señales que evocan al estado fisiológico de la planta, es preferible adoptar la definición funcional de la senescencia, al menos para describir el efecto de la anulación de la autofagia.

Ahora es necesario recordar el experimento donde se evalúa el efecto de la glutamina en la aparición de las VAS del capítulo III (sección 3.8). En discos de tabaco obtenidos de hojas maduras, se aplicó glutamina exógena mientras eran incubados en oscuridad. Este tratamiento provocó un marcado retraso en la caída del contenido de clorofila y proteínas en relación al control sin glutamina. También se retrasó la aparición de las VAS evidenciado por la ausencia de marca con *Lysotracker Red*. En este experimento se buscó simular en el tejido foliar un entorno rico en compuestos nitrogenados, lo cual tuvo como consecuencia el retraso apreciable de los síntomas de la senescencia. En este mismo sentido, en plantas de tabaco complementadas con piruvato marcado mediante C^{13} se evidenció que la enzima Piruvato ortofosfato quinasa (PPDK) está implicada en la síntesis de la glutamina empleada para la exportación durante la senescencia. La sobre-expresión de PPDK en *Arabidopsis* bajo control del promotor de *SAG12*, tiene como consecuencia directa el aumento del contenido de glutamina intracelular y un marcado retraso de la senescencia (Taylor *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren un tipo de regulación de la senescencia donde

habría implicados sensores del estado nutricional. Este razonamiento puede explicar el fenotipo de los mutantes de autofagia con senescencia acelerada, donde podría haber degradación incompleta de proteínas y falta de exportación de aminoácidos. En *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que el complejo TOR censa los niveles de glutamina intracelulares y de ser estos bajos conduce a la des-represión de los factores de transcripción GLN3, RTG1 y RTG3, vinculados al mecanismo de autofagia, degradación de proteínas y síntesis de Glutamina (Crespo *et al.*, 2002).

Comparación de las VAS con estructuras autofágicas.

Una de las primeras menciones en la bibliografía de estructuras autofágicas en tabaco fue la realizada por Moriyasu *et al.* (1996). Trabajando con células en cultivo heterotrófico, analizaron su comportamiento en un medio carente de sacarosa. A las 48 h de incubación registraron la degradación de 40 % de las proteínas y la aparición concomitante de pequeñas vesículas ácidas de aproximadamente 1 μm de diámetro. Además detectaron *in situ* la actividad de Pirofosfatasa, lo cual sugirió que estas estructuras eran ácidas. La adición de E-64, un inhibidor de proteasas cisteínicas, detenía la degradación de proteínas en esas mismas condiciones, indicando que la degradación era debida a la actividad de proteasas cisteínicas. La mayor actividad de Pirofosfatasa, H^+ -ATPasa vacuolar y de proteasas cisteínas se halló en la fracción subcelular de autolisosomas, y el tratamiento con 3-metiladenina, un inhibidor de autofagia, bloqueó la aparición de esos autolisosomas (Takatsuka *et al.*, 2004 y 2011). En base a estos datos, los autores sugieren que estas vesículas corresponden a autolisosomas que empleando un mecanismo de autofagia, degradan proteínas para compensar la ausencia de cadenas carbonadas en un tratamiento de hambre.

La participación de la autofagia en la degradación de Rubisco fue sugerida, mediante evidencia directa, por Chiba *et al.* (2003). En hojas senescentes de trigo inmunodetectaron Rubisco y Glutamina Sintetasa en pequeñas vesículas de entre 0.4 y 1.2 μm de diámetro en el citoplasma y la vacuola central. Estas vesículas fueron denominadas “*Rubisco containing bodies*”. Morfológicamente fueron caracterizadas

como vesículas rodeadas por dos o más membranas y por un lumen con electrodensidad similar al estroma cloroplástico.

La autofagia es el mecanismo empleado por las RCB para transportar Rubisco desde los cloroplastos hasta la vacuola central (Ishida *et al.*, 2008). El uso de concanamicina A en hojas senescentes de *Arabidopsis* produjo la acumulación de RCB dentro de la Vacuola Central en el genotipo salvaje, pero en el mutante *atg5-1* no fueron detectadas. Este resultado junto con la localización de ATG8:GFP, sirvieron como evidencia para determinar que las RCB corresponden a un tipo de macroautofagia implicada en la degradación de la fracción estromática de los cloroplastos durante la senescencia foliar (Wada & Ishida, 2009).

Recientemente se describió una estructura similar a las RCB en hojas de arroz sometidas a estrés salino (Yamane *et al.*, 2012). La inmunolocalización de Rubisco mostró estructuras de entre 0.5 y 1 μm rodeadas por dos membranas, próximas a protrusiones cloroplásticas, en el citoplasma y en la vacuola central. Los autores especulan que se tratan de RCB, en este caso inducidos por estrés salino, lo que sugiere que una parte del mecanismo de degradación de cloroplastos estaría compartido entre el proceso de senescencia y la respuesta al estrés.

En la bibliografía no hay intentos de integrar estas observaciones en un modelo explicativo de la senescencia foliar a pesar del empleo de sistemas experimentales semejantes, que llevan a tener resultados también semejantes y que ejecutan la misma función, degradar el componente estromático de los cloroplastos.

A continuación se muestra una tabla comparativa de las RCB y las VAS. La caracterización de las VAS incluye los resultados derivados de este trabajo.

	RCB	VAS
Especies	Trigo, Tabaco, Arabidopsis.	Soja, Tabaco, Arabidopsis.
Situación	Senescencia natural, inducida por oscuridad y hambreado.	Senescencia natural e inducida por oscuridad (hambreado no evaluado)
Componentes inmunolocalizados por MET.	Estroma (Rubisco, Glutamina Sintetasa)	Pirofosfatasa vacuolar.
Componentes localizados por	CT-DsRed (péptido señal de localización)	CT-GFP (péptido señal de localización cloroplástica)

fluorescencia	cloroplástica fusionado a DsRed) SSU-GFP (Rubisco) ATG8-GFP Sin Clorofila (en RCB dentro de Vacuola Central)	fusionado a GFP) ATG8:GFP ManI:YFP Clorofila R6502 (proteasas cisteínicas) Lysotracker Red y Lysosensor Yellow/Blue (marcadores de compartimientos ácidos)
Localización subcelular (técnica empleada)	Citoplasma (sólo con MET) Vacuola Central (Confocal y MET)	Citoplasma (Confocal y MET)
Presencia de ATG8	ATG8:GFP	ATG8:GFP Inmunodetección de ATG8 en las VAS
Knock out de autofagia.	Ausentes en la Vacuola Central de atg7-1 y atg5-1.	Presentes en citoplasma de atg7-1
Acidez	No reportado	Sí (<i>Lysotracker Red</i>)
Tamaño (µm)	0,4 - 1,2	0,4 - 1,2
Capacidad lítica	No reportado	Sí (proteasas cisteínicas)
Citas originales	Chiba <i>et al.</i> , 2003. Ishida <i>et al.</i> , 2008. Wada <i>et al.</i> , 2009. Izumi <i>et al.</i> , 2010. Yamane <i>et al.</i> , 2012.	Otegui <i>et al.</i> , 2005. Martínez <i>et al.</i> , 2008.

Sobre el efecto de ATG5-1 en las VAS.

La identificación de estructuras autofágicas ha sido objeto de discusión (Klionsky *et al.*, 2007; Mitou *et al.*, 2009), aunque es evidente en la bibliografía el uso frecuente de tres metodologías: 1- empleo de marcadores fluorescentes: Monodansilcadaverina, Naranja de Acridina y *Lysotracker Red*; 2- marcadores moleculares de la autofagia fusionados a proteínas fluorescentes: ATG8:GFP, ATG5:GFP, etc.; y 3- el estudio de mutantes de autofagia mediante microscopia confocal o electrónica.

En plantas de *Arabidopsis* que expresan ATG8:GFP, la inducción de la senescencia por oscuridad o por hambre permite detectar cuerpos autofágicos en la Vacuola Central, pero sólo cuando se aplica un tratamiento previo de 20 h de Concanamicina A (Wada *et al.* 2009). No hay reportes de estructuras autofágicas

detectadas *in vivo* fuera de la Vacuola Central, y/o sin el empleo de Concanamicina A. En los mutantes de autofagia, *atg5-1*, *atg7-1* y *atg10-1*, inducidos a “senescer” y tratados con Concanamicina A no se observan cuerpos autofágicos en la Vacuola Central (Thompson *et al.*, 2005; Ishida *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2008). De esta manera los autores aseguran que esas estructuras detectadas a través de ATG8:GFP son derivadas de autofagosomas. El argumento empleado para el uso de Concanamicina A, es que al inhibir la acidificación de la Vacuola Central, los cuerpos autofágicos no pueden ser degradados por las proteasas dependientes de la acidez y entonces estos se acumulan volviéndose evidentes. Sin embargo no explica por qué no se observan autofagosomas marcados de la misma manera con ATG8:GFP fuera de la Vacuola Central, donde ATG8 se une a fosfatidil-etanol-amina para la formación de autofagosomas. En un trabajo similar a los expuestos en este párrafo, los autores concluyen que en el mutante *atg5-1* no ocurre un *knock out* de la autofagia sino un *knock down*, en otras palabras: la autofagia se atenúa pero no se interrumpe (Hayward & Dinesh-Kumar *et al.*, no publicado, citado en Hayward & Dinesh-Kumar, 2011).

Con el mismo objetivo pero con una técnica distinta se evaluó la participación de la autofagia en las VAS (Otegui *et al.*, 2005). Se compararon protoplastos de *Arabidopsis* salvaje y *atg7-1* tratados con LysoTracker Red y R6502 (marcadores de acidez y actividad de proteasas cisteínicas, respectivamente). En los dos genotipos, se detectaron patrones punteados similares. Este resultado sugirió que el origen de las VAS es al menos independiente de ATG7 (Otegui *et al.*, 2005).

En la Figura 5 se muestran células de hojas de líneas *wt* y *atg5-1* inducidas a “senescer” en oscuridad durante 48 h, marcadas con *LysoTracker Red* pero sin tratamiento con Concanamicina A. En ambos genotipos se observa un patrón similar de vesículas marcadas con *LysoTracker Red* en el citoplasma, pero una observación más detallada muestra en el genotipo salvaje la coexistencia de 2 poblaciones de vesículas diferenciadas por su diámetro. En promedio las poblaciones tienen 970 nm y 590 nm de diámetro. En el mutante de autofagia, la presencia de las vesículas de mayor diámetro es escasa e incluso ausente. Además, la marca del *LysoTracker* en *atg5-1* no es tan discreta como en el *wt*, lo cual dificulta definir las vesículas que tienden en algunos casos a aglomerarse (Figs. 4 y 5). Posiblemente el mutante *atg5-1* altere la vía

de las VAS. Sin embargo no hay evidencias que determinen en qué punto del desarrollo de las VAS ocurriría esta alteración.

A pesar de que en el *wt* la diferencia entre las dos poblaciones es evidente, la cuantificación de esta diferencia puede resultar poco robusta dado que el límite de resolución de la microscopia confocal para longitudes de onda alrededor de 600 nm (el pico de emisión del *Lysotracker Red*) es de alrededor de 250 nm. Para continuar este análisis será necesario comparar los dos genotipos, el salvaje y el mutante de autofagia, mediante microscopía electrónica de transmisión. Si efectivamente existieran dos poblaciones, debería definirse si ambas pueden ser atribuidas a VAS en distintas etapas de su desarrollo.

Las VAS poseen ATG8

Numerosos trabajos han demostrado que la construcción ATG8:GFP es un marcador *in vivo* de autofagosomas y cuerpos autofágicos en levaduras, plantas y animales (Suzuki *et al.*, 2001; Mizushima *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2004; Contento *et al.*, 2005; Slavikova *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005; Klionsky *et al.*, 2007; Mitou *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha reportado que la expresión de ATG8:GFP bajo el promotor 35S podría inducir la agregación de moléculas de ATG8:GFP de manera inespecífica y constituirse en artefactos de la técnica (Klionsky *et al.*, 2007; Yoshimoto *et al.*, 2012), y que ATG8 puede expresarse aún en líneas donde *atg5* está inactivado (Klionsky *et al.*, 2008).

En las Figuras 9 y 10 se muestran microfotografías confocales de células y de tejido de *Arabidopsis* que expresan ATG8:GFP. El tratamiento de inducción de la senescencia y la marcación con *Lysotracker Red* fue el mismo empleado normalmente para la visualización de VAS en tabaco y *Arabidopsis*. En las Figuras se muestra la colocalización de *Lysotracker Red*, clorofila y ATG8:GFP en vesículas de aproximadamente 900 nm. Esto evidencia que la mayoría de las VAS poseen ATG8 entre sus componentes, y que la posibilidad de estar detectando agregados inespecíficos de ATG8:GFP que colocalizan con clorofila y que además son ácidos, es remota. El hecho de que algunas VAS no colocalicen con ATG8:GFP sugiere que la

presencia de las VAS es previa a la “decoración” de su membrana con ATG8. En la Figura 11 se muestra un control interno de la localización específica de la marca de ATG8:GFP. En el mismo tejido, se observan células senescentes, evidenciadas por la disminución de la señal de clorofila cloroplástica, y células no senescentes. Sólo en las células senescentes se observan VAS marcadas con *Lysotracker Red* y ATG8:GFP, a pesar de tratarse del mismo genotipo y de células contiguas.

Para conocer si ATG8 también está presente en las VAS de tabaco, y que se trata de un patrón generalizado e independiente de la expresión de ATG8:GFP, se empleó el anticuerpo contra ATG8a de *Arabidopsis thaliana* para realizar un *western-blot* de la fracción enriquecida en VAS (F3) obtenida de hojas senescentes de tabaco. En la Figura 8 se muestra el *blot* con extracto crudo, F3, y F3 concentrada hasta llegar a la misma cantidad de proteína que el extracto crudo. Sólo en la muestra de F3 concentrada se detectan tres bandas de 70, 33 y 14 kDa, siendo la de 14 kDa la banda de proteína atribuida a ATG8 (Chung *et al.*, 2009; Li & Vierstra, 2012). El resto de las bandas inmunodetectadas con el anticuerpo contra ATG8 podrían ser atribuidas a dímeros y tetrámeros de ATG8, formas encontradas durante la formación de estructuras autofágicas *in vitro* (Nakatogawa *et al.*, 2007). El patrón de bandas encontradas en la F3 concentrada es similar a la reportada para hojas de Trigo bajo estrés osmótico e hídrico (Kuzuoglu-Ozturk *et al.*, 2012).

El mecanismo de autofagia está involucrado en las VAS

La definición de autofagia ha cambiado en los últimos 15 años. Originalmente fue descrito como un mecanismo de degradación en masa de los componentes celulares en el marco de la muerte celular programada. Hoy se interpreta a la autofagia como un proceso altamente regulado, con amplia participación a lo largo del desarrollo de los organismos y con la capacidad de degradar componentes celulares de manera selectiva (tratado en: Li & Vierstra, 2012; Liu & Bassham, 2012).

La profundización del estudio de la autofagia ha revelado que existe una vía canónica, donde participan todos los genes tradicionalmente asociados a la senescencia, y vías no canónicas donde algunos de los componentes considerados

esenciales para la autofagia canónica no participan (Nishida *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2011; Honig *et al.*, 2012). Incluso, el proceso de autofagia ha sido interpretado, en el sentido más amplio, como un mecanismo de tráfico de vesículas que transportan material desde el citoplasma hasta la vacuola/lisosoma para su degradación o reciclado (Huang & Klionsky, 2002). Una evidencia de la complejización del estudio de la autofagia es la diversidad de isoformas de genes involucrados en este mecanismo. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado nueve isoformas de atg8 y dos isoformas de atg13 cuyos patrones de expresión son variables lo cual sugiere que actúan de manera específica (Contento *et al.*, 2004; Slavikova *et al.*, 2005).

Entonces, la autofagia estaría involucrada en varios mecanismos de degradación que terminan con el transporte de componentes celulares a la vacuola central. Algunos ejemplos de estos estudios revelan la existencia de: mitofagia (autofagia de mitocondrias, Lemasters *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2009; Minibayeva *et al.*, 2012), peroxifagia (autofagia de peroxisomas, Asakura *et al.*, 2009), y autofagia de proteínas agregadas (Toyooka *et al.*, 2006), lo cual describe la versatilidad de acción de la autofagia.

Mediante tres enfoques metodológicos distintos e independientes se ha evaluado la relación o independencia de las VAS y la Autofagia: 1- Mediante la comparación del patrón de vesículas marcadas con *Lysotracker Red* entre el mutante de autofagia atg5-1 y el genotipo salvaje de *Arabidopsis thaliana*; 2- La colocalización de las VAS con la proteína ATG8 fusionada a GFP, también en *Arabidopsis thaliana*; y 3- La inmunodetección de ATG8 en la fracción enriquecida en VAS de *Nicotiana tabacum*. Estos resultados indican que la autofagia está implicada, al menos, en algún punto en el desarrollo de las VAS. Sin embargo, no hay suficiente evidencia que permita contestar las siguientes preguntas, que sin lugar a dudas guiarán futuros experimentos: ¿Está la autofagia involucrada en la biogénesis de las VAS? ¿La autofagia participa en la incorporación de las VAS a la Vacuola Central? ¿Las VAS y las RCB son vías independientes para la degradación de componentes estromáticos o constituyen descripciones de distintas etapas de una única vía?

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones y Perspectivas.

El presente trabajo de tesis tuvo el objetivo de profundizar el conocimiento sobre las Vacuolas Asociadas a la Senescencia en tres áreas temáticas principales:

- 1- El desarrollo, entendido como la variación temporal de las VAS, su biogénesis y el efecto de moduladores de la senescencia.
- 2- La caracterización de la actividad biológica de las VAS en el dismantelamiento del aparato fotosintético.
- 3- La relación entre el mecanismo de autofagia y el desarrollo de las VAS.

A continuación se expondrán los aportes de cada uno de los capítulos de esta tesis, las relaciones más importantes entre ellos y algunas propuestas experimentales para la continuación de esta línea de investigación.

1- Sobre el Desarrollo de las VAS.

Las VAS fueron caracterizadas como vesículas líticas asociadas a la senescencia foliar. Sin embargo no se conocía el periodo de actividad de las VAS ni los cambios en su abundancia/intensidad durante la senescencia. Mediante un seguimiento diario, se registró que las VAS se manifiestan principalmente a modo de un pulso durante 48 h aproximadamente entre el segundo y cuarto día posteriores al comienzo de la inducción de la senescencia en oscuridad. Este pulso se correlacionó con el periodo de mayor degradación de clorofilas y proteínas en la hoja y con la expresión de dos proteasas cisteínicas marcadoras de senescencia (SAG12 y NtCP1) y de la H⁺-ATPasa vacuolar. Entonces, dos representantes de la actividad de las VAS, proteasas cisteínicas y una bomba de protones que permite acidificar compartimientos líticos (*v.g.* vacuola central, vesículas prevacuolares, y presumiblemente las VAS), se expresan en simultaneo con la aparición de las VAS. La sincronización entre el periodo de mayor actividad proteolítica de la hoja y el pulso de las VAS sugiere, aunque no de manera inequívoca, que las VAS

constituyen el mecanismo de degradación de cloroplastos más activo durante la senescencia.

La relación entre el pulso de abundancia de las VAS y la degradación de los cloroplastos se refuerza con los ensayos de aplicación de citocininas y Glutamina. Es conocido el efecto que poseen las citocininas en el retraso e incluso en la reversión de los síntomas de la senescencia. Los resultados mostrados en esta tesis permiten sugerir que el efecto de las citocininas retrasando la degradación de proteínas y clorofilas está relacionado con la inhibición de la aparición de las VAS (al menos hasta las 72 h post inducción).

La aplicación exógena de L-Glutamina (Gln), el aminoácido más importante para la exportación de N de hojas senescentes de tabaco, también bloqueó la aparición de las VAS y la degradación de clorofilas y proteínas. Este ensayo muestra que las VAS no sólo están reguladas por señales hormonales (etileno y citocininas) sino también por glutamina, una molécula que se ha propuesto como molécula señal del estado nutricional de la célula/planta.

Entonces las VAS constituyen un mecanismo de degradación de cloroplastos altamente regulado y discreto en el tiempo. Estas características permitirían atribuir a las VAS protagonismo en la etapa pre-apoptótica o regulada de la senescencia foliar, aunque serán necesarios estudios de la reversibilidad del mecanismo de las VAS para establecerlo. La demostración de la existencia de una relación entre las VAS y la autofagia (Capítulo V) avala su papel como un mecanismo regulado tendiente a la re-utilización de componentes estromáticos. Esta interpretación justifica futuros esfuerzos tendientes a la manipulación de la vía de las VAS en especies agronómicas, tanto para acelerar la removilización de nutrientes como para retrasar la senescencia durante la post-cosecha.

La biogénesis de las VAS ha sido un interrogante desde su primer reporte. La detección *in vivo* de α -manosidasa I en las VAS, permite relacionar al Aparato de Golgi con el origen de las VAS. Entonces, en un esquema sobre la biogénesis de las VAS, los cloroplastos aportarían los componentes a ser degradados (Rubisco, Glutamina Sintetasa,

PsaA y clorofilas libres), y el Aparato de Golgi aportaría α -manosidasa, y la maquinaria potencial para acidificar las VAS (posiblemente ATPasas y PPasas). El empleo de otros marcadores del Aparato de Golgi y estudios en tiempo real del trayecto de vesículas post-golgi y de las VAS, podrían ayudar a entender la biogénesis de las VAS.

Se ha sugerido que las VAS podrían fusionarse a la Vacuola Central donde la degradación de proteínas continuaría hasta la obtención de aminoácidos. Sin embargo, no hay evidencias directas sobre esta especulación. Será necesario estudiar el destino de las VAS para comprender de manera integral su función en la degradación de componentes estromáticos y su posible papel en la removilización de nutrientes de las hojas.

En resumen, se derivan las siguientes conclusiones sobre el desarrollo de las VAS:

- a)- El periodo de mayor degradación de clorofilas y proteínas durante la senescencia foliar está sincronizado con un pulso de VAS. (Secciones 3.2, 3.4, 3.5 y 3.6)
- b)- Los genes de proteasas cisteínicas asociadas a la senescencia SAG12 y NtCP1, junto con la H^+ -ATPasa vacuolar, presentan un patrón de expresión sincronizado con el pulso de VAS. (Sección 3.5)
- c)- Las citocininas y la glutamina retrasan la aparición de las VAS. (Secciones 3.7, 3.8)
- d)- El Aparato de Golgi participa en la biogénesis de las VAS. (Sección 3.9)

2- Sobre la actividad biológica de las VAS.

Las VAS fueron inicialmente identificadas como compartimientos líticos, sin embargo no se conocían los responsables de la degradación de Rubisco. Con el empleo de inhibidores específicos de las diferentes clases de proteasas se logró determinar que la degradación de la subunidad grande de Rubisco en las VAS es inhibida *in vitro* por E-64, un inhibidor de proteasas cisteínicas. En un sistema experimental *in vivo*, mediante la observación de células aisladas de tabaco se pudo detectar la actividad de las proteasas cisteínicas en las VAS con el marcador R6502. La actividad de esas proteasas fue inhibida con un pre-tratamiento con E-64, evidenciado por la ausencia de hidrólisis de R6502

(ausencia de fluorescencia de R6502), sin que se afectara la visualización de las VAS mediante *Lysotracker Red*. *In vivo*, E-64 inhibió la degradación de la subunidad grande de Rubisco, sugiriendo la participación de las VAS en la degradación *in vivo* de las proteínas del estroma del cloroplasto. La aplicación de Concanamicina A, un inhibidor de la H^+ -ATPasa vacuolar, también inhibió la actividad de proteasas cisteínicas en las VAS *in vivo*. En este caso, el efecto de la Concanamicina A fue comprobado por la disminución e inclusive ausencia de la marca de *Lysotracker Red*. Resulta importante recordar en este punto, que el patrón de degradación de clorofilas y proteínas coincide temporalmente con la presencia de las VAS, y la expresión de la proteasa SAG12 y la subunidad C de la bomba de H^+ -ATPasa (Secciones 3.2, 3.4 y 3.5). Estos resultados refuerzan la idea de que las VAS son el compartimiento con mayor actividad de proteasas cisteínicas en la célula vegetal senescente y colaboran a comprender el funcionamiento de las VAS.

Como resultado de la aplicación de Concanamicina A durante la senescencia foliar de *Nicotiana tabacum*, se observó un retraso significativo de la degradación de proteínas del extracto crudo. Luego de tres días de la inducción de la senescencia por oscuridad, el tratamiento con Concanamicina A produjo la retención de un fragmento de 50 kDa de la subunidad grande de Rubisco (LSU). Es decir, con este tratamiento se inhibió la proteólisis de la mayor parte de Rubisco. Este resultado permite sugerir que la proteólisis de la LSU es dependiente de la acidez (de la H^+ -ATPasa), que en los experimentos anteriores fue atribuida mayoritariamente a las VAS (Secciones 4.3, 4.4).

Se detectaron dos bandas de proteasas cisteínicas de 40 y 33 kDa en las VAS de tabaco mediante una técnica basada en la actividad de las proteasas. La fracción enriquecida en VAS fue tratada con el marcador DCG-04 (E-64 biotinilado) que se une al sitio activo de las proteasas cisteínicas, y pueden ser detectadas en un *western blot* mediante estreptavidina. Resta por conocer la identidad de las proteasas cisteínicas que protagonizan la degradación de Rubisco, entre otras proteínas cloroplásticas en las VAS. Este desafío deberá apuntar a obtener fracciones de VAS los más purificadas posibles en plantas con genomas secuenciados (*v.g. Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*) que faciliten el posterior análisis bioinformático.

Además de la degradación de Rubisco, ha sido reportada la degradación de la proteína PsA en las VAS. Esta proteína del centro de reacción del Fotosistema I, pudo ser detectada en las VAS mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Como había sido reportado en *Arabidopsis*, en esta tesis se muestra la localización de la proteasa cisteínica SAG12 fusionada a GFP colocalizando con la marca de *Lysotracker Red* en las VAS de *Nicotiana tabacum*. La presencia de esta proteasa en las VAS no sólo confirma su carácter lítico, sino también avala su participación durante la senescencia foliar como también se mostró en el Capítulo III de esta tesis.

A partir de estos resultados se pueden realizar las siguientes conclusiones:

a)- La actividad lítica de las VAS es mayoritariamente debida a proteasas cisteínicas. (Secciones 4.1, 4.3)

b)- La actividad de proteasas cisteínicas de las VAS es inhibida *in vivo* por E-64 y Concanamicina A (inhibidores de proteasas cisteínicas y de la bomba de H^+ -ATPasa vacuolar respectivamente). (Secciones 4.3, 4.4)

c)- Se detectaron y purificaron dos bandas de proteasas cisteínicas de 40 y 33 kDa concentradas en las VAS en relación al extracto crudo y los cloroplastos. (Sección 4.2)

d)- La proteasa cisteínica SAG12 está presente en las VAS de *Nicotiana tabacum*. (Sección 4.5)

e)- La proteína PsA, del centro de reacción del Fotosistema I, se detectó en las VAS mediante la técnica de inmunofluorescencia. (Sección 4.6)

3- Sobre la relación entre la Autofagia y las VAS.

La autofagia participa en la degradación de componentes celulares durante la senescencia de las plantas, como se revisó en el capítulo V. Sin embargo, los mutantes de la vía autofágica muestran un ritmo de degradación acelerado en comparación con el genotipo salvaje. Esta posible contradicción no ha podido ser explicada.

En esta tesis se muestran algunas evidencias que apuntan a la degradación incompleta de proteínas en el mutante *atg5-1* durante la senescencia. La alteración en el mecanismo de degradación de proteínas podría guardar relación con la falta de exportación de aminoácidos desde hojas senescentes de *atg5-1*. Estos resultados permiten sugerir una hipótesis *ad hoc* que explica la aceleración de la degradación en los mutantes de autofagia: “En los mutantes de autofagia, la degradación de proteínas es incompleta lo cual impide la removilización de aminoácidos (v.g. Glutamina)” Entonces, ante la merma en la exportación de aminoácidos se estimula la degradación de proteínas para satisfacer las necesidades nutricionales de los órganos destino, lo cual constituye un ciclo de retroalimentación positiva. Como se mostró en el capítulo III, la aplicación exógena de L-Glutamina en hojas senescentes de tabaco, produjo el retraso de la degradación de clorofila y proteínas (Sección 3.8). Simultáneamente, la aplicación de Gln tuvo como consecuencia la ausencia de las VAS en hojas incubadas en oscuridad durante 72 h. Evidentemente, la concentración de glutamina está al menos modulando la degradación de los cloroplastos. Será necesario realizar nuevos ensayos con el fin de evaluar si es la misma Gln la que regula la degradación asociada al mecanismo de autofagia. Para analizar la degradación incompleta de proteínas en *atg5-1*, se planea realizar un seguimiento de la variación del patrón de pesos moleculares de las proteínas y péptidos a lo largo de la senescencia, en comparación con el genotipo salvaje mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se analizó el patrón de marca del *Lysotracker Red* en hojas senescentes de *atg5-1* y *wt* mediante microscopia confocal. En el genotipo salvaje se detectaron dos poblaciones de vesículas, que en promedio tienen 590 y 970 nm de diámetro, de las cuales sólo algunas de las de mayor tamaño también colocalizaron con clorofila. De manera similar, la marca de la Man1: YFP evidenció dos poblaciones, donde sólo las vesículas de mayor tamaño, atribuibles a las VAS, poseían fluorescencia de clorofila (Sección 3.9). Con un patrón de *Lysotracker Red* diferente, las hojas senescentes de *atg5-1* poseían escasas vesículas grandes, pero si se detectaron vesículas pequeñas y cúmulos de mayor tamaño de difícil definición. Este resultado sugiere que la vía de degradación de los cloroplastos

donde las VAS están involucradas, estaría siendo alterada por la mutación en *atg5-1*, aunque no es posible establecer el alcance de esta alteración.

Mediante la observación de plantas de *Arabidopsis* que expresan ATG8a:GFP, se colocó este marcador de la autofagia con la señal de *Lysotracker Red* y clorofila en las VAS. Sólo algunas VAS no poseen marca detectable de ATG8, lo cual muestra que es un patrón generalizado. Sin embargo, la presencia de algunas VAS cuyas membranas no están “decoradas” con ATG8, podría sugerir que la existencia de las VAS es previa a la unión de ATG8 a su membrana. Dado que ATG8 participa en el mecanismo autofágico de transporte a la Vacuola Central, esto es consistente con la idea de que las VAS descargan su contenido en la Vacuola Central. El estudio de la localización de ATG8:GFP en las VAS de mutantes de autofagia, podría aportar valiosa información para dilucidar la función de la autofagia en la vía extraplastidial de desmantelamiento de los cloroplastos.

Se detectó ATG8 en la fracción enriquecida en VAS (F3) de hojas senescentes de *Nicotiana tabacum*. En comparación con el extracto crudo de las mismas hojas, ATG8 está concentrado en la F3. Este resultado es complementario a la detección *in vivo* de ATG8 en las VAS, y refuerza la idea de que las VAS están relacionadas con el mecanismo de autofagia. Sin embargo, se necesitará del empleo de otros marcadores de las VAS (v.g. SAG12:GFP, Rubisco:GFP) y el uso de más mutantes de la autofagia (v.g. *atg9-1*, *KOs* de Beclina) para determinar apropiadamente la participación de la autofagia en el desarrollo de las VAS. Dado que es posible obtener una fracción enriquecida en VAS, será posible estudiar la relación de ATG8 con componentes de la membrana y la interacción con otros elementos de la autofagia, mediante la identificación de complejos presentes en esta fracción (v.g. bandas de 33 y 70 kDa en el perfil de las VAS, Sección 5.4). La ampliación del marco teórico que implica la participación de la autofagia en el desarrollo de las VAS, facilitará en el futuro, el desarrollo de diseños experimentales tendientes a profundizar nuestro conocimiento sobre la degradación extraplastidial de los cloroplastos.

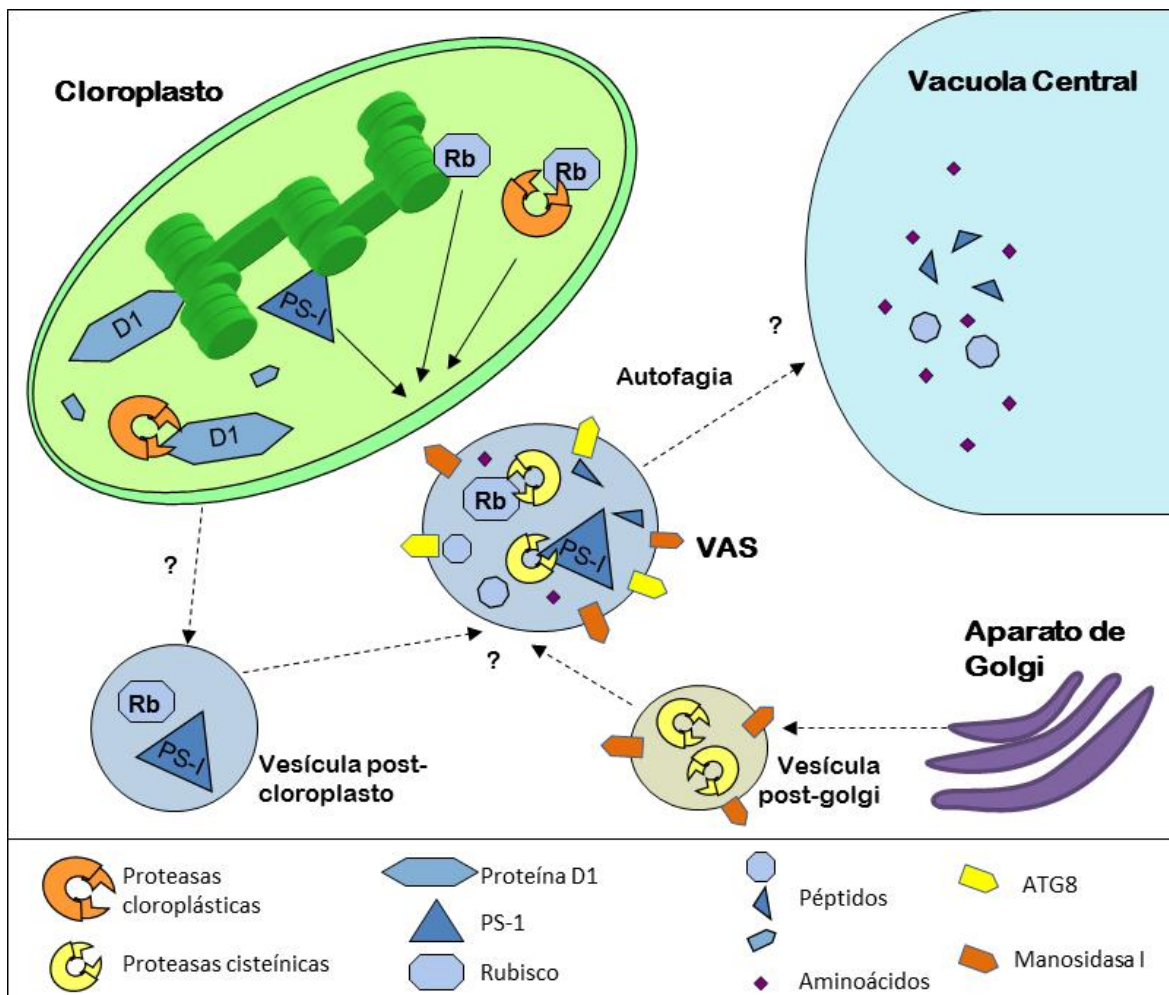
Sobre la base de los resultados expuestos es posible concluir que:

a)- En el mutante de autofagia atg5-1, se produce la acumulación de péptidos y/o proteínas, y la ausencia de exportación de aminoácidos desde las hojas senescentes. (Secciones 5.1 y 5.2)

b)- En el mutante de autofagia atg5-1 ocurre una alteración en el patrón de marca del *Lysotracker Red* en hojas senescentes. (Sección 5.3)

c)- Las VAS adquieren ATG8 en su desarrollo. (Sección 5.4)

En base a los aportes originales de esta tesis doctoral se completan algunas características y pasos en el esquema integrativo presentado en el capítulo introductorio (Figura 9, traducido de Costa et al., 2012).



Bibliografía

A

Adam Z, Clarke AK (2002). Cutting edge of chloroplast proteolysis. Trends in Plant Science. 7: 451-465.

Andersson A, Keskitalo J, Sjodin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandré K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Bhalerao R, Brunner A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundeberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen M et al. (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. Genome Biology. 5: R24.1-R24.13.

Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin 5 and gin6, reveals a central role of the plant vegetative development by sugar. Genes Development. 14: 2085-2096.

Asakura M, Ninomiya S, Sugimoto M, Oku M, Yamachita S, Okuno T, Sakai Y, Takano Y (2009) Atg26-mediated pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. The Plant Cell. 21: 1291-1304.

Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by supply of mitochondria with respiratory substrates. The Journal of Cell Biology. 33:1251-1263.

B

Baehrecke EH (2003) Autophagic programmed cell death in Drosophila. Cell Death and Differentiation. 10: 940-945.

Balibrea Lara ME, Gonzales Garcia MC, Fatima T, Ehneß R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T. (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. The Plant Cell 16:1276–1287.

Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Phsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. Autophagy. 2: 2-11.

- Bayer RG, Stael S, Csaszar E, Teige M (2011) Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics*. 11:1287-1299.
- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*. 65:43-58.
- Beyene G, Foyer CH, Kunert KJ (2006) Two new cysteine proteinases with specific expression pattern in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1431-1443.
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, *et al.* (2003) Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology*. 131:430-442.
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim Y, Penfold CA, Jenkins D, Zhang C, Morris K, Wild DL, Ott S, Rand D, Beynon J, Denby K, Mead a, Buchanan-Wollaston V (2011) High-Resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell*. 23:873-894.
- Brouquisse R, Evrard A, Rolin D, Raymond P, Roby C (2001) Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. *Plant Physiology*. 125:1485-1498.
- Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal Experimental Botany*. 48: 181-199.
- Buchanan-Wollaston V, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*. 1:3-22.
- Bushnell TP, Bushnell D, Jagendorf AT (1993) A purified zinc protease of pea chloroplasts, EP1, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology*. 103: 585-591.

C

- Carde JP, Camara B, Cheniclet C (1988) Absence of ribosomes in Capsicum chromoplasts. *Planta*. Vol. 173, 1: 1-11.
- Cárdenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ, Heitman J (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & Development*. 13:3271-3279.
- Chan TF, Bertram PG, Ai W, Zheng XFS (2001) Regulation of APG14 expression by the GATA-type transcription factor GLN3p. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 6463-6467.
- Chen MH, Liu LF, Chen YR, Wu HK, Yu SM (2003) Expression of α -amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells in coordinately regulated by sugar nutrient. *The Plant Journal*. 6: 625-636.
- Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T (2003) Exclusion of Ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiology*. 44:914-921.
- Chory J, Nagpal P, Peto CA (1991) Phenotypic and genetic analysis of det2, a new mutant that affects light-regulated seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 3: 445-459.
- Chrispeels MJ, Boulter D (1975) Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung bean: role of endopeptidase. *Plant Physiology*. 55. 1031-1037.
- Christensen LE, Below FE, Hageman RH (1981) The effects of ear removal on senescence and metabolism of maize. *Plant Physiology*. 68:1180-1185.
- Chung T, Phillips AR, Vierstra R (2010) ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in Arabidopsis require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A and ATG12B loci. *The Plant Journal*. 62: 483-493.
- Chung T, Suttangkakul A, Vierstra RD (2009) The ATG Autophagy conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant Physiology*. 149:220-234.

Bibliografía.

- Clouse SD, Sasse JM (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. Annual Rev. of Plant Physiology. Plant Molecular Biology. 49: 427-451.
- Contento AL, Kim SJ, Bassham DC (2004) Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to sucrose starvation. Plant Journal. 42:598-608.
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC (2005) Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. The Plant Journal. 42:598-608.
- Costa ML, Martínez DE, Gomez FM, Carrión CA, Guiamet JJ (2012) Chloroplast Protein Degradation: Involvement of Senescence-Associated Vacuoles. En prensa. En "Advances in Photosynthesis and Respiration" Chloroplast development during leaf growth and senescence. Series Editors: Govindjee and Thomas D. Sharkey, Springer - EEUU.
- Cowan AK, Freeman M, Bjorkman PO, Nicander B, Sitbon F, Tillberg E (2005) Effects of senescence-induced alternation in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. Planta. 221: 81-814.
- Crafts-Brandner SJ, Holzer R, Feller U (1998) Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. Physiologia Plantarum. 102: 192-200.
- Crafts-Brandner SJ, Klein RR, Klein P, Holzer R, Feller U (1996) Coordination of protein and mRNA abundances of stromal enzymes and abundances of the Clp protease subunits during senescence of *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves. Planta. 200:312-318.
- Crespo JL, Powers T, Fowler B, Hall MN (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. PNAS. 99:6784-6789.
- Crowell DN, Kadlecsek AT, John MC, Amasino RM (1990) Cytokinin-induced mRNAs in cultured soybean cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:8815-8819.

D

Bibliografía.

- Dai N, Schaffer A, Petrikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner k, Levine A, Granot D (1999) Overexpression of arabidopsis hexokinase in Tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell*. 11: 1253-1266.
- De DN (2000) *Plant Cell Vacuoles. An Introduction*. Collingwood, Australia: CSIRO Publising.
- Desclos , Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Nonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice JC (2009) A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilization during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics*. 9: 3580-3608.
- Desimone M, Henke A, Wagner E (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Isolated chloroplasts of Barley. *Plant Physiology*. 111:789-796.
- Desimone M, Wagner E, Johanningmeier U (1998) Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta*. 205:459-466.
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006) Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 18: 715-730.
- Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*. 4: 851–865.
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 33105-33114.
- Donnison IS, Gay AP, Thomas H, Edwards KJ, Edwards D, James CL, Thomas AM, Ougham HL (2007) Modification of nitrogen remobilization, grain fell and leaf senescence in maize (*Zea mays*) by transposon insertional mutagenesis in a protease gene. *New Phytologist*. 173:481-494.

E

- Ellis RJ (1979) Most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*. 4: 241-244.

Esteban-García B, Garrido-Cárdenas JA, Lopez-Alonso D, García-Maroto F (2010) A distinct subfamily of papain-like cystein proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. Journal of Plant Physiology. 167:1101-1108.

F

Feller U (1990) Nitrogen remobilization and protein degradation during senescence. En: Abrol YP, ed. Nitrogen in higher plants. Somerset: Research Studies Press Ltd, 195–222.

Feller U (2004) Proteolysis. En “Plant cell death processes”. Noodén LD ed. San Diego: Academic Press. 107-123.

Feller U, Anders I, Mae T (2008) Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. Journal of Experimental Botany. 59: 1615-1624.

Feller U, Fischer A (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. Crit. Rev. Plant Sci. 13: 241-273.

G

Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by auto-regulated production of cytokinin. Science. 270: 1986-1988.

Gepstein S (1988) Photosynthesis. En “Senescence and Aging in Plants”. Noodén LD, Leopold AC, eds. Academic Press, San Diego. 85-109.

Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Nesher MFO, Yriv I, Dor C, Bassani M (2003) Large scale identification of leaf senescence-associated genes. The Plant Journal. 36: 629-642.

Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense response in Arabidopsis. Current Opinion of Plant Biology. 2: 280-286.

Gombert J, Etienne P, Ourry A, Dily FL (2006) The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. Journal of Experimental Botany. 57:1949-1956.

Bibliografía.

- Grbic V (2003) SAG2 and SAG12 protein expression in senescing Arabidopsis plants. *Physiol Plant*. 119:1-7.
- Greenbaum D, Medzihradsky K, Burlingame A, Bogyo M (2000) Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chemistry Biology*. 7:569-581.
- Gregersen P, Holm P, Krupinska K (2008) Leaf senescence and nutrient remobilization in barley and wheat. *Plant Biology*. 10 (supple1): 37-49.
- Gregersen PL, Holm PB (2007) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*. 5:192-206.
- Guamet JJ, Pichersky E, Noodén LD (1999) Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell and Physiology*. 40: 986-992.
- Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and development regulation. *Comptes Rendus Biologies*. 333:382-391.
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé MP, Avice JC, Masclaux-Daubresse C (2012) Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist*. 194:732-740.
- Guo V, Cai Z, Gan S (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*. 27: 521-548.
- Guo Y (2012) Towards systems biological understanding of leaf senescence. *Plant Molecular Biology*. DOI 10-1007/s11103-012-9974-2.

H

- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiology*. 129:1181-1193.

Bibliografía.

- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiology*. 129:1181-1193.
- Hayward AP, Dinesh-Kumar SP (2011) What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annual Review of Phytopathology*. 49: 557-576.
- He Y, Gan S (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell*. 14. 805-815.
- Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB (1993) Developmental and age- related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell*. 5: 553-564.
- Herman EM, (1994) Multiple origins of intravacuolar protein accumulation of plant cells. *Advances Structural Biology*. 3:243-283.
- Hidema J, Makino A, Kurita Y, Mae T, Ojima K (1992) Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PSII in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Cell Physiology*. 33: 1209-1204.
- Hidema J, Makino A, Mae T, Ojima K (1991) Photosynthetic characteristics of rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Physiology*. 97: 1287-1293.
- Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G (2012) A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of Arabidopsis plants to carbon starvation. *The Plant Cell*. 24:288–303.
- Hortensteiner S (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 55-77.
- Htwe NMPS, Yuasa T, Ishibashi Y, Tanigawa H, Okuda M, Zheng SH, Iwaya-Inoue M (2011) Leaf senescence of soybean at reproductive stage is associated with induction of autophagy-related genes, GmATG8c, GmATG8i and GmATG4. *Plant Production Science*. 14:141-147.

Bibliografía.

Huang WP, Klionsky DJ (2002) Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. Cell structure and function. 27:409-420.

Hutchins MU and Klionsky DJ (2001) Vacuolar localization of oligomeric α -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 276:20491–20498.

Hörtensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. Journal of Experimental Botany. 53:927-937.

I

Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T (2008) Mobilization of Rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplast to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagy process. Plant Physiology. 148: 142-155.

Izumi M, Wada S, Makino A, Ishida H (2010) The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-Containing Bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. Plant Physiology. 154:1196-1209.

J

Jing HG, Sturre MJ, Hille J, Dijkel PP (2002) Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. Plant Journal. 32: 51:63.

Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoop GM, Pot CS, de Visser R, van Rhijn JA, Gan SM, Amasino RM (2000) Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. Plant, Cell and Environment. 23: 279-289.

K

Kato Y, Miura E, Ido K, Ifuku K and Sakamoto W (2009) The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. Plant Physiology. 151: 1790-1801.

- Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, Chatani H, Kondo Y, Nakano T, Yokota A, Sato F (2004) The DNA-binding protease CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphato Carboxylase/Oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*. 220, 97-104.
- Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA, Thumm M, Hussey PJ (2004) Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Letters*. 567:302-306.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) Ctr1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the RAF family of protein-kinases. *Cell*. 72: 427-441.
- Kirisato T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000) Reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal Cell Biology*. 151:263-276.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H y 1267 co-autores más (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 8:445-544.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*. 3:181-206.
- Kohler RH, Cao J, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science*. 276: 2039-2042.
- Kokubun N, Ishida H, Makino A, Mae T (2002) The degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase into the 44 kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant Cell Physiology*. 43:1390-1395.
- Krapp A, Quick WP, Sitt M (1991) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. *Planta*. 186:58-69.

Krul WR (1974) Nucleic acid and protein metabolism of senescing and regenerating soybean cotyledons. *Plant Physiology*. 54:36-40.

Krupinska K (2007) Fate and activities of plastids during leaf senescence. En "The structure and function of plastids". Wise RR, Hooper JK eds. 433-449.

Kuzuoglu-Ozturk D, Yalcinkaya OC, Akpinar BA, Mitou G, Korkmaz G, Gozuacik D, Budak H (2012) Autophagy-related gene, TdAtg8, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response. *Planta*. 236:1081-1092.

L

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 8:3-5.

Leyser O (2002) Molecular genetics of auxin signaling. *Annual Rev. of Plant Biology*. 53: 377-398.

Li F, Vierstra RD (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*. 17:526:537.

Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 115-136.

Liu Y, Bassham DC (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 63: 215-237.

Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*. 121: 567-577.

Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 92:322–328.

M

- Madison SL, Nebenfuhr A (2011) Live-cell imaging of dual-labeled golgi stacks in tobacco BY-2 cells reveals similar behaviors for different cisternae during movement and brefeldin A treatment. *Molecular Plant*. 4:896-908.
- Mae T (2004) Leaf senescence and nitrogen metabolism. En "Plant cell death processes" Noodén LD ed. San Diego: Academic Press. 157-168.
- Makino A, Sakuma H, Sudo E, Mae T (2003) Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant and Cell Physiology*. 44: 952-956.
- Manufo DB, Colombo MI (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal Cell Science*. 114:3619-3629.
- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dobuis F, Balliau T, Valor B, Davanture M, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B (2006) Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell*. 18:3252-3274.
- Martínez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guamet JJ (2007) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal Experimental Botany*. 58:1099-1107.
- Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guamet JJ (2008) "Senescence-associated vacuoles" are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*. 56: 196-206.
- Marty F (1978) The biogenesis of vacuoles: insights from microscopy. *Adv. Bot. Res*. 25: 1-42.
- Matile P (1975) The lytic compartment of plant cells. In *Cell Biology Monographs*, Vol 1. Editado por Alfert M, Beermann W, Rudkin G, Sandritter W, Sitte P. 1-175. Springer-Verlag, Berlin.
- Mattoo AK, Aharoni N (1988) Ethylene and plant senescence. En: "Senescence and Aging in Plants" Noodén LD, Leopold AC eds. Academic Press, San Diego. 241-280.
- McGrath ME (1999) The lysosomal cysteine proteases. *Annual Rev Biophys Biomol Struct*. 28:181-204.

- Miao F, Bai L, LuShuFang, Cao CL, Zhang SW (2009) Effects of excessive ear removal on functional leaf assimilate accumulation and transport in wheat. *Journal of Northwest A&F University-Natural Science Edition*. 37:89-93.
- Migge A, Bork C, Hell R, Becker TW (2000) negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. *Planta*. 211:587-595.
- Minibayeva F, Dmitrieva S, Ponomareva A, Ryabovol V (2012) Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 59:9-11.
- Minimikawa T, Toyooka K, Okamoto T, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma*. 218: 144-153.
- Mitou G, Budak H, Gozuacik D (2009) Techniques to study autophagy in plants. *International Journal of Plant Genomics*. ID: 451357. doi:10.1155/2009/451357.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic Mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*. 15:1101-1111.
- Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology*. 52: 89-118.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science*. 300: 332-336.
- Moore S (1968) Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the Ninhydrin reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 243: 6281-6283.
- Moreno , García-Murria MJ, Marín-Navarro J (2008) Redox modulation of Rubisco conformation and activity through its cysteine residues. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1605-1614.

Moriyasu Y, Klionsky DJ (2004) Autophagy in plants. In Autophagy. Editado por Klionsky D. Eureka.com/Landes Bioscience. 208-215.

Moriyasu Y, Ohsumi Y (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiology*. 111: 1233-1241.

Morris K, Mackerness AH, Page S, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal*. 23: 677-685.

Munne-Bosch S & Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Cert Rev Plant Sci*. 21: 31-57.

N

Nair U, Yen WL, Mari M, Cao Y, Xie Z, Baba M, Reggiori F, Klionsky DJ (2012) A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 8:780-793.

Nakano T, Nagato N, Kimura T, Sekimoto M, Kawaide H, Murakami S, Kaneko Y, Matsushima H, Kamiya J, Sato F, Yoshida S (2003) CND41, a chloroplast nucleoid protein that regulates plastid development, causes reduced gibberellin content and dwarfism in tobacco. *Physiol Plant*. 117: 130-136.

Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*. 130:165-178.

Nebenfuhr A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlick JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB, Staehelin LA (1999) Stop-and-Go movements of plant golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiology*. 121: 1127-1141.

Niewiadomska E, Polzien L, Desel C, Rozpadek P, Miszalski Z, Krupinska K (2009) Spatial patterns of senescence and development-dependent distribution of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Journal of Plant Physiology*. 166: 1057-1058.

Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 491: 654-658.

Niwa Y, Kato T, Tabata S, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Moriyasu Y (2004) Disposal of chloroplasts with abnormal function into the vacuole in *Arabidopsis thaliana* cotyledon cells. *Protoplasma*. 223:229-232.

Noh YS, Amasino RM (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology*. 41: 181-194.

Noodén LD & Leopold AC (1978) Phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission. En *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise* (DS Letham, OB Goodwin, TJB Higgins, eds) Vol II: 329-369.

Noodén LD (1988) Whole plant senescence. In *Senescence and Aging in Plants* (LD Noodén and AC Leopold, Eds). Academic Press. 391-439.

Noodén LD, Guamet JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*. 101: 746-753.

Noodén LD. (2004) Plant cell death processes. Libro editado por Noodén LD en ELSEVIER Academic Press. Cap. 1: 1-14.

O

Okamoto K, Kondo-Okamoto NK, Ohsumi Y (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental Cell*. 17:87-97.

Ondizighi CA, Christopher DA, Cho EJC, Chang SC, Staehelin LA (2008) Arabidopsis protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *The Plant Cell*. 20:2205-2220.

Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guamet JJ (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *The Plant Journal*. 41: 831-844.

P

Palmer GE (2007) Autophagy in the Invading Pathogen. *Autophagy*. 3: 251-253.

Parrott D, Yang L, Shama L, Fischer AM (2005) Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon “feast” conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta*. 222: 989-1000.

Parrott DL, Martin JM, Fischer AM (2010) Analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf senescence and protease gene expression: a family C1A cysteine protease is specifically induced under conditions characterized by high carbohydrate, but low to moderate nitrogen levels. *New Phytologist*. 187:313-331.

Parrott DL, McInerney K, Feller U, Fischer AM (2007) Steam girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist*. 176:56–69.

Pastori GM, del Río LA (1997) Natural Senescence of Pea Leaves. *Plant Physiology*. 113: 411-418.

Peoples MB, Dalling MJ (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. En “Senescence and aging in plants” Noodén LD, Leopold AC eds. Academic Press. 181-217.

Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD (2008) The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagy vesicle formation in Arabidopsis thaliana. *Genetics*. 178: 1339-1353.

Pourtau N, Mares M, Purdy S, Quentin N, Ruel a, Wingler A (2004) Interactions of abscísico acid and sugar signaling in the regulation of leaf senescence. *Planta*. 219: 765-772.

Prins A, van Heerden PDR, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH (2008) Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1935-1950.

Q

Quirino VF, Noh YS, Himmelblau E, Amasino RM (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plants Science*. 5: 278-282.

R

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production oxidative stress and H₂O₂-metabolizing enzyme. *Plant Physiology*. 115: 137:149.

Rao MY, Davis KR (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: The role of salicylic acid. *Plant Journal*. 17: 603-614.

Ravinowitz JD, White E (2010) Autophagy and metabolism. *Science*. 330: 1344-11348.

Reape TJ, McCabe PF (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*. 180: 13-26.

Reyes FC, Chung T, Holding D, Jung R, Vierstra R, Otegui MS (2011) Delivery of prolamins to the protein storage vacuole in maize aleurone cells. *The Plant Cell*. 23:769-784.

Robinson DG, Albrecht S, Moriysu Y (2004) The V-ATPase inhibitors concanamycin A and bafilomycin A lead to Golgi swelling in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*. 224:255-260.

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 675-709.

Rose TL, Bonneau L, Der C, Marty-Mazars D, Marty F (2006) Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. *Biology of the Cell*. 98:53-67.

Rosenvasser S, Mayak S, Friedman H (2006) Increase in reactive oxygen species (ROS) and in senescence-associated gene transcript (SAG) levels during dark-induced senescence of *Pelargonium* cuttings, and the effect of gibberellic acid. *Plant Science*. 170: 873-879.

Roulin S Feller U (1998) Dithiothreitol triggers photooxidative stress and fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact pea chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 849-856.

Rudella A, Friso G, Alonso JM, Ecker JR, van Wijk KJ (2006) Down-regulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 18: 1704–1721.

S

Saint-Jore-Dupas C (2006). Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell*. 18, 3182–3200.

Sakamoto W (2006) Protein degradation machineries in plastids. *Annual review of Plant Biology*. 57: 599-621.

Sakamoto W (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol* 57: 599-621.

Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer, Burstin J (2004) Proteome reference maps of vegetative tissues in Pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiology*. 135:2241-2260.

Schippers JHM, Jing HC, Hille J, Dijkwel PP (2007) developmental and hormonal control of leaf senescence. En “Senescence processes in plants” Gan S, ed. Oxford: Blackwell Publishing. 145-170.

Schmidt GW, Delaney SK (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol Genet Genomics*. 283:233-241.

Bibliografía.

- Shan X, Li C, Peng W, Gao B (2011) New perspective of jasmonate function in leaf senescence. *Plant Signaling and Behavior*. 6:4: 575-577.
- Shibuya K, Yamada T, Ichimura K (2009) Autophagy regulates progression of programmed cell death during petal senescence in Japanese morning glory. *Autophagy*. 5: 546-547.
- Simova-Stoilova L, Vaseva I, Grigorova B, Demirevska K, Feller U (2009) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 200-206.
- Slavikova S, Shy G, Yao Y, Glozman R, Levanony H, Pietrokovsky S, Elazar Z, Galini G (2005) The autophagy-associated ATG8 gene family operates both under favorable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany*. 56:2839-2849.
- Soudry E, Ulitzur S, Gepstein S (2005) Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves: *in planta* analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *Journal of Experimental Botany*. 56: 695-702.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*. 53:449-475.
- Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L (2010) The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 152: 1263-1273.
- Sun X, Peng L, Guo J, Chi W, Ma J, Lu C, Zhang L (2007) Formation of Deg5 and Deg8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19:1347-1361.
- Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B, Mackerness AH (1998) UV-B induced responses in Arabidopsis thaliana: role of salicylic acid and ROS in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic PR proteins. *Plant and Cell Environment*. 21: 685-694.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO Journal*. 20:5971–5981.

T

Takatsuka c, Inoue Y, Higuchi T, Hillmer S, Robinson DG, Moriyasu Y (2011) Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant & Cell Physiology*. 52: 2074-2087.

Takatsuka C, Inoue Y, Matsuoka K, Moriyasu Y (2004) 3-Methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiology*. 45:265-274.

Taylor L, Nunes-Nesi A, Parsley K, Leiss A, Leach G, Coates S, Wingler A, Fernie AR, Hibberd JM (2010) Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *The Plant Journal*. 62:641-652.

Thoenen M, Feller U (1998) Degradation of glutamine synthetase in intact chloroplasts isolated from pea (*Pisum sativum*) leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25:279–286.

Thoenen M, Herrmann B, Feller U (2007) Senescence in wheat leaves: is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco? *Acta Physiologia Plantarum*. 29: 339-350.

Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD (2003) Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1127–1132.

Thompson AR, Doelling JH, Suttankakul A, Vierstra RD (2005) Autophagy nutrient recycling in Arabidopsis directed by ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology*. 138: 2097-2110.

Thompson AR, Vierstra RD (2005) Autophagy recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 165-173.

Tollenaar M, Daynard TB (1982) Effect of source sink ratio on dry matter accumulation and leaf senescence of *Zea mays*. Can J Plant Science. 62:855-860.

Toyooka K, Moriyasu Y, Goto Y, Takeuchi M, Fukuda H, Matsuoka K (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by macroautophagy mechanism in nutrient-starved plant cells. Autophagy. 2:96-106.

U

Ueda T, Seo S, Ohashi Y, Hashimoto J (2000) Circadian and senescence-enhanced expression of tobacco cysteine protease gene. Plant Molecular Biology. 44:649-657.

Urquhart AA, Joy KW (1981) Use of phloem exudate technique in the study of amino acid transport in pea plants. Plant Physiology. 68:750-754.

V

van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI, Kunze R (2006) Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. Plant Physiology. 141:776-792.

van der Hoorn RAL, Leeuwenbergh MA, Bogyo M, Joosten MHA, Peck SC (2004) Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. Plant Physiology. 135:1170-1178.

van Doorn W & Woltering EJ (2004). Senescence and programmed cell death: substance or semantics? Journal of Experimental Botany. 55: 2147-2153.

van Doorn W (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. Trends in Plant Science. 10: 478-483.

van Doorn W (2008) Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? Journal Experimental Botany. 59: 1963-1972.

van Doorn W (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. Journal of experimental botany. 11: 1-13.

Bibliografía.

van Doorn WG, Woltering EJ (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends in Plant Science. 10: 117-122.

Villiers TA (1967) Cytolysosomes in long-dormant plant embryo cells. Nature. 214: 1359-1357.

Viotti C, Bubeck J, Dieter Stierhof Y, Krebs M, Langhans M, van der Berg W, van Dongen W, Richter S, Geldner N, Takano J, Jurgens G, de Vries S, Robinson DG, Schumacher K (2010) Endocytic and secretory traffic in arabidopsis merge in the trans-golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. The Plant Cell. 22:1344-1257.

W

Wada S, Ishida H (2009) Chloroplast autophagy during senescence of individually darkened leaves. Plant Signaling & Behavior. 4:565-567.

Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. Plant Physiology. 149: 885-893.

Wagtaff C, Leverentz MK, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead AD, Rogers HJ (2002) Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. Journal of Experimental Botany. 53: 233-240.

Wasternack C, Hause B (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 72: 165-221.

Weaver LM, Amasino RM (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. Plant Physiology. 127: 876-886.

Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Molecular Biology. 37: 455-469.

Weckenmann D, Martin P (1984) Endopeptidase activity and nitrogen mobilization in senescing leaves of *Nicotiana rustica* in light and dark. Physiologia Plantarum. 60: 333-340.

Bibliografía.

- Wingler A, Mares M, Pourtau N (2004) Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *The New Phytologist*. 161:781-789.
- Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1063-1066.
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*. 2: 291-399.
- Wingler A, Roitsch T (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology*. 10: 50-62.
- Winter H, Lohaus G, Heldt HW (1992) Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in Barley leaves. *Plant Physiology*. 99:996-1004.
- Wittenbach VA, Lin W, Hebert RR (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplast in mesophyll protoplast from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiology*. 69: 98-102.
- Woo JT, Shinohara C, Sakai K, Hasumi K, Endo A (1992) Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. *The Journal of Antibiotics*. 45:1108-1116.
- Woo R, Kim JH, Nam HG, Lim PO (2004) The delayed leaf senescence mutants of arabidopsis, ore1, ore3 and ore9 are tolerant to oxidative stress. *Plant and Cell Physiology*. 45: 923-932.

X

- Xiong L, Zhu JK (2003) Regulation of abscísico acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 133: 29:36.
- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 42:535-546.

Xiong Y, Contento AL, Bassham DC (2007) Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis. *Autophagy*. 3: 257-258.

Y

Yamada K, Lim J, Dale H (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. *Science*. 302: 842-846.

Yamada K, Matsushima R, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2001) A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology*. 127:1626-1634.

Yamada T, Ichimura K, Kanekatsu M, van Doorn WG (2009) Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of *Ipomoea nil* Petals. *Plant and Cell Physiology*. 50: 610-625.

Yamada T, Takatsu Y, Manabe T, Kasumi M, Marubashi W (2003) Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of *gladiolus*. *Plant Science*. 164: 213-221.

Yamaguchi D, Hu D, Matsumoto N, Yamamoto K (2010) Human XTP3-B binds to α 1-antitrypsin variant null^{Hong Kong} via the C-terminal MRH domain in a glycan-dependent manner. *Glycobiology*. 20:348-355.

Yamane K, Mitsuya S, Taniguchi M, Miyake H (2012) Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. *Plant, Cell and Environment*. 35:1663-1671.

Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular Biology of the Cell*. 17:5094-5104.

Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Natural Cell Biology*. 12:814-822.

Yin Y, Wang ZY, Mora-García S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate expression and promote stem elongation. *Cell*. 109: 181-191.

Yoshida S (2003) Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 79-84.

Yoshimoto K (2012) Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant & Cell Physiology*. 53:1355-1365.

Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *The Plant Cell*. 16: 2967-2983.

Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu K (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *Plant Cell*. 21:2914-2927.

Z

Zaltsman A, Ori N, Adam Z (2005) Two types of FtsH subunits are required for chloroplast biogenesis and photosystem II repair in Arabidopsis. *Plant Cell*. 17:2782-2790.

Zapata JM, Guéra A, Esteban-Carrasco A, Martín M, Sabater B (2005). Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death and Differentiation*. 12: 1277-1284.

Zavaleta-Mancera HA, Franklin KA, Ougham HJ, Thomas H, Scott IM (1999a) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany*. 50:1677–1682.

Bibliografía.

- Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H and Scott IM (1999b) Regreening of senescent Nicotiana leaves: II. Re-differentiation of plastids Journal of Experimental Botany. 50: 1683–1689.
- Zhang Lf, Rui Q, Xu LL (2005) Degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphato carboxylase/oxygenase in wheat leaves. Journal Integral Plant Biology. 47: 60-66.
- Zhang Z, Zhu H, Tang Y, Cui T, Geng T, Chen C, Cui Y (2007) Preparation and application of streptavidin magnetic particles. Science China Ser B-Chem. 50:127-134.
- Zimmermann P, Zentgraf U (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. Cellular & Molecular Biology Letters. 10: 515-534.